



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GUILHERME NOGUEIRA AIRES

POLIMORFISMOS DO PD1 EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

*PD1 POLYMORPHOSMS IN WOMEN WITH OVARIAN CARCINOMA*

CAMPINAS

2018

GUILHERME NOGUEIRA AIRES

POLIMORFISMOS DO PD1 EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

*PD1 POLYMORPHOSMS IN WOMEN WITH OVARIAN CARCINOMA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de Oncologia Ginecológica e Mamária.

Dissertation presented to the Post-Graduate Program in Tocoginecology of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requirements required to obtain the Master's Degree in Health Sciences in the area of Gynecological and Mammary Oncology.

ORIENTADORA: PROF. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO GUILHERME NOGUEIRA AIRES E ORIENTADO PELA  
PROFA DRA SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 306583/2014-3; FAPESP, 2016/07822-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ai76p      Aires, Guilherme Nogueira, 1984-  
             Polimorfismos do PD1 em mulheres com carcinoma de ovário / Guilherme Nogueira Aires. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

             Orientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain.  
             Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

             1. Neoplasias ovarianas. 2. Platina. 3. Sobrevida. 4. Polimorfismo genético. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** PD1 polymorphisms in women with ovarian carcinoma

**Palavras-chave em inglês:**

Ovarian neoplasms

Platinum

Survival

Polymorphism, Genetic

**Área de concentração:** Oncologia Ginecológica e Mamária

**Titulação:** Mestre em Ciências da Saúde

**Banca examinadora:**

Sophie Françoise Mauricette Derchain [Orientador]

Levon Badiglian Filho

Cesar Cabello dos Santos

**Data de defesa:** 17-12-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Tocoginecologia

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**GUILHERME NOGUEIRA AIRES**

---

---

**ORIENTADORA: PROFA. DRA SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN**

---

---

**MEMBROS:**

**1. PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN**

**2. PROF. DR. LEVON BADIGLIAN FILHO**

**3. PROF. DR. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS**

---

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora  
encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

---

**DATA DA DEFESA: 17/12/2018**

---

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a minha esposa Mariana e minha filha Manuela por todo o apoio em momentos difíceis e por serem a base da minha vida. Agradeço minha esposa pelo amor e apoio incondicionais, pela ajuda nos momentos mais difíceis com seu olhar de esperança e compreensão como parte fundamental da minha vida e minha filha que fez parte da minha vida ao longo deste caminho e por ser responsável pela minha vontade de sempre seguir em frente. Dedico também às pacientes por toda sua colaboração e por acreditarem na pesquisa.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain pela orientação, amizade e apoio incondicional na realização desta dissertação e pela responsabilidade por grande parte de minha formação.*

*A Amanda Canato Ferracini pela ajuda, conhecimento e companheirismo durante todo este tempo.*

*A Profa Dra. Priscila Mazzola pela ajuda e orientação.*

*A Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima e ao pessoal do Laboratório de Genética do Câncer, principalmente Ângelo Brito e Leisa Aguiar pela ajuda e conhecimento.*

*Ao Prof. Dr. Luis Otavio Sarian pela paciência, ajuda e disponibilidade sempre que precisei.*

*Ao José Paulo Guida pela ajuda sempre que precisei e solicitei.*

*Aos funcionários das unidades de internação e ambulatorios pela ajuda na coleta de sangue.*

*As pacientes por doarem um pouco de seu tempo e atenção para que a pesquisa seguisse seu caminho e encontra-se seus objetivos neste momento de suas vidas.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) número 306583/2014-3 e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo(FAPESP) números 2018/00070–2 e 2016/07822-4 que financiaram este estudo*

*Por fim a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram e contribuíram para este estudo.*

## RESUMO

**Introdução:** A identificação de polimorfismos associados à resposta à quimioterapia e sobrevida pode contribuir na individualização dos cuidados das mulheres com carcinoma de ovário submetidas à quimioterapia com carboplatina e paclitaxel. **Objetivos:** avaliar a associação entre polimorfismos herdados do gene *PDCDI* e as características clínico-patológicas, resposta à quimioterapia e sobrevida em mulheres com carcinoma de ovário. **Sujeitos e métodos:** Mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma de ovário atendidas no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) de janeiro de 2014 a abril de 2018 que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco CAISM (056) tiveram sangue periférico coletado. Os polimorfismos analisados pelo método multiplex de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou PCR em tempo real foram PD1.1 (c.-606G>A), PD1.5 (c.804C>T), PD1.9 (c.644C>T). Os dados foram analisados através do pacote estatístico R. O nível de significância assumido foi de 5%. **Resultados:** Mulheres com carcinomas do tipo II tiveram uma proporção significativamente maior de carcinomas avançados (84,2% vs 20,9%,  $p<0,001$ ), níveis mais altos de CA 125 (1452 U/mL vs 661,4 U/mL,  $p=0,0029$ ) e maior proporção de necessidade de tratamento neoadjuvante (62,5% vs 11,1%,  $p<0,001$ ); maiores taxas de resistentes / refratárias em relação à resposta à quimioterapia (54,5% vs 18,5%,  $p<0,001$ ) e maior proporção de vivas com doença / morte (77,1% vs 23,2%,  $p<0,001$ ) comparativamente àquelas com carcinomas tipo I. A distribuição dos genótipos de PD1.1 (c.-606G> A) não mostrou diferença significativa em relação aos aspectos clínicos. A idade média das mulheres com os genótipos CC e CT do PD1.5 SNP (c.804C> T) foi maior do que aqueles com genótipo TT ( $p=0,02$ ). Houve uma proporção significativamente maior do genótipo CC do PD1.9 SNP (c.644C> T) em mulheres com carcinomas serosos ( $p=0,01$ ), estágio avançado ao diagnóstico ( $p=0,01$ ) e doença residual pós-cirúrgica ( $p=0,009$ ), quando comparado aos genótipos CT ou TT. **Conclusão:** este estudo demonstrou que os polimorfismos do gene *PDCDI* foram associados com presença em carcinomas serosos, estágio avançado e presença de doença residual pós-cirurgia. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre polimorfismos do PD1 e resposta a quimioterapia, sobrevida livre de progressão ou sobrevida global.

**Palavras-chave:** Polimorfismos, Carcinoma de Ovário, Platina, Sobrevida.

## ABSTRACT

**Introduction:** The identification of polymorphisms associated with the response to chemotherapy and survival may contribute to the individualization of the care of women with ovarian carcinoma submitted to chemotherapy with carboplatin and paclitaxel. **Objective:** The objectives of the study were to evaluate the association between inherited polymorphisms and pathological clinical characteristics, response to chemotherapy and survival in women with ovarian carcinoma. **Methods:** For this study women with histological diagnosis of ovarian carcinoma attended at the Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Center for Comprehensive Care for Women's Health (CAISM) of the State University of Campinas (UNICAMP) from January 2014 to April 2018 and after signing the Informed Consent Term of the CABSMBiobank (056) had blood collected. Polymorphisms analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) multiplex or real-time PCR were PD1.1 (c.-606G> A), PD1.5 (c.804C> T), PD1.9 (c. 644C). The data were analyzed through the statistical package R. The level of significance assumed was 5%. **Results:** Comparing women with type I and type II carcinomas there was a significantly higher proportion of women with advanced carcinoma (84.2% vs 20.9%,  $p<0.001$ ), higher levels of CA 125 (1452 U/mL vs 661.4 U/mL) , and a higher proportion of neoadjuvant treatment (62.5% vs 11.1%,  $p<0.001$ ), higher resistant / refractory rates in relation to response to chemotherapy (54.5% vs 18.5%,  $p<0.001$ ) and greater proportion of live with disease / death (77.1% vs 23.2%,  $p<0.001$ ) among those with type II carcinoma. The distribution of genotypes of PD1.1 (c.-606G> A) showed no significant difference in relation to clinical aspects. The mean age of women with CC and CT genotype PD1.5 SNP (c.804C> T) was higher than those with TT genotype ( $p = 0.02$ ). There was a significantly higher proportion CC genotype PD1.9 SNP (c.644C> T) in women with serous carcinoma ( $p=0.01$ ), advanced stage at diagnosis ( $p=0.01$ ) and post-surgical residual disease ( $p=0.009$ ) when compared to CT or TT genotypes. No significant association was found among PD1 polymorphism and response to chemotherapy, progression free survival or overall survival. **Conclusion:** This study demonstrated that *PDCDI* gene polymorphisms were associated with presence of serous carcinoma, advance stage and presence of post-surgery residual disease.

**Key-words:** Polymorphisms, Ovarian Carcinoma, Platinum, Survival.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	– Base nitrogenada adenina
ABC	– <i>ATP binding cassette</i>
ATP	– adenosina trifosfato
AUC	– Área abaixo da curva
BRCA1	– <i>breast cancer 1</i>
BRCA2	– <i>breast cancer 2</i>
C	– Base nitrogenada citosina
CA125	– <i>Cancer Antigen 125</i>
CAISM	– Hospital da Mulher – Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti
CEP	– Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	– Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTCAE	– Critérios Comuns de Toxicidade
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
dNTP	– Desoxiribonucleotídeo
DP	– Desvio padrão
EDTA	– etilenodiaminotetracético
EHW	– Equilíbrio de Hardy–Weinberg
EORTC QLQ	– <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality–of–Life Questionnaire</i>
FAPESP	– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	– Faculdade de Ciências Médicas
FIGO	– Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
G	– Base nitrogenada guanina
GCIC	– <i>Gynaecological Cancer Inter Group</i>
GSH	– glutationa reduzida
<i>GST</i>	– Glutathione–S–transferases
GSTM1	– Glutathione–S–transferases <i>mu</i>
GSTT1	– Glutathione–S–transferases <i>theta</i>
HR	– Hazard ratio
IC	– Intervalo de confiança
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
ITIM	– <i>immunoreceptor tyrosine–based inhibitory motif</i>
ITSM	– <i>immunoreceptor tyrosine–based switch motif</i>

LAGECA	– Laboratório de Genética do Câncer
LAPE	– Laboratório de Patologia Experimental
Min	– Minuto
MOS SF–36	– <i>Medical Outcomes Study Short Form–36</i>
MRD1	– <i>Multidrug Resistance gene</i>
NCI	– <i>National Cancer Institute</i>
NCCN	– National Comprehensive Cancer Network
OMS	– Organização Mundial da Saúde
P	– Valor de p (probabilidade estatística)
PARP-1	– <i>Poly Adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase-1</i>
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
PD-1	– <i>programmed death 1</i>
PI3K	– <i>phosphoinositide 3–27 kinase</i>
PKB	– <i>protein kinase B</i>
Rpm	– Rotações por minuto
SG	– Sobrevida global
SHP–1	– <i>Src homology region domain–containing phosphatase–1</i>
SLP	– Sobrevida livre de progressão
SNPs	– <i>Single–Nucleotide Polymorphisms</i>
<i>Src</i>	– <i>homology region domain–containing phosphatase–2</i>
Taq	– Enzima polimerase <i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOI	– <i>O trial outcome index</i>
U/mL	– unidade por mililitro
UNICAMP:	– Universidade Estadual de Campinas
$\chi^2$	– Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Carcinoma de ovário.....	12
1.2. Tratamento do Carcinoma de Ovário .....	15
1.3. Resistência à Quimioterapia .....	16
1.4. PD1 (Programmed cell death 1).....	18
1.5. Polimorfismos .....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral:.....	23
2.2. Objetivos específicos: .....	23
3. MÉTODOS.....	24
3.1. Seleção dos Sujeitos .....	24
3.2. Análise dos genótipos dos polimorfismos gênicos.....	26
3.3. Extração do DNA.....	27
3.4. Processamento do sangue total e obtenção de leucócitos .....	27
3.5. Extração do DNA de leucócitos.....	27
3.6. Identificação dos genótipos dos polimorfismos gênicos .....	28
3.7. ASPECTOS ÉTICOS .....	30
3.8. ANÁLISE DE DADOS .....	30
4. RESULTADOS .....	32
Artigo: PD1 polymorphism is associated with presence of serous carcinoma, advanced stage and post-surgical residual disease in ovarian carcinoma.....	32
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS .....	56
8. ANEXOS.....	66
ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	66
ANEXO 2: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	68
ANEXO 3: ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS HERDADOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO .....	78
ANEXO 4: CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Carcinoma de ovário

O câncer de ovário atualmente é a quinta causa de morte entre as neoplasias malignas em mulheres, correspondendo a 47% das mortes secundárias a tumores ginecológicos e, entre eles, o de pior sobrevida (1-3). Acomete normalmente mulheres acima de 50 anos (1). Nos Estados Unidos, ocorreram por volta de 22.000 novos casos de câncer de ovário em 2016, o que corresponde a uma incidência de 9 a 17 por 100.000 mulheres e cerca de 14.000 mortes relacionados a essa neoplasia (3,4). No Brasil foram registrados 6.150 casos novos em 2017 com risco estimado em 5.89 casos a cada 100.000 mulheres. A estimativa para o estado de São Paulo em 2018 corresponde a 8 casos para cada 100.000 mulheres sendo o oitavo mais incidente e com sobrevida média de 40% em 5 anos com a mesma projeção para cada ano do biênio 2018-2019 (5).

Em relação aos fatores de risco para câncer de ovário, um dos mais significativos corresponde a história familiar. A síndrome hereditária conhecida como carcinoma mama/ovário caracteriza-se pela história familiar de múltiplos parentes com câncer de mama e/ou ovário afetados em idade precoce, o que corresponde a 10% dos casos totais de câncer de ovário (6). A grande maioria dos casos relacionados a síndrome ocorrem em mulheres portadoras das mutações deletérias nos genes supressores BRCA 1 e BRCA 2 (7). O risco esporádico da mulher desenvolver câncer de ovário corresponde a 1 a cada 75 mulheres (8), porém em mulheres de 70 anos o risco acumulado para câncer de ovário significa 35% a 45% em relação ao BRCA 1 e 15% a 18% em relação ao BRCA 2 (8,9). Além disso, a mulher que é parente de primeiro grau de um caso índice tem um risco de 3 a 7 vezes maior que a população geral de ter câncer de ovário (7-10).

Outros fatores de risco correspondem a maior idade à menopausa e menor idade à menarca, além de baixa paridade, sustentados pela hipótese da “ovulação incessante” pelo maior número de ciclos ovulatórios durante a vida e maior probabilidade de mutações espontâneas por conta do reparo no epitélio ovariano (8); endometriose, principalmente em relação ao carcinoma endometrióide e células claras provavelmente pela mesma patogênese e características moleculares e genéticas (11); terapia hormonal pós menopausa permanece controverso porém uma re-análise colaborativa apresentou aumento de risco para câncer de ovário mesmo em mulheres com uso menor do que 5 anos (12); e obesidade em relação a alguns tipos histológicos específicos (13). No entanto, constituem-se fatores protetores o uso de contraceptivo hormonal oral e lactação pela associação com a teoria do bloqueio da “ovulação

incessante” descrita previamente (14-16). Outro fator de proteção descrito nos últimos anos corresponde laqueadura tubária, principalmente em carcinomas ligados a endometriose como o endometrióide e o células claras (17).

Em relação ao estadiamento para câncer de ovário, este constitui-se cirúrgico ajudando a entender a condição clínica, prognóstico e planejamento para um adequado tratamento e comparação entre pacientes de diversos centros oncológicos (18). O primeiro passo corresponde ao diagnóstico histológico definitivo. É utilizado principalmente em suspeitas de estádios iniciais pois em carcinomas de ovário avançados, na maioria das vezes, fica óbvio a aparência de metástases abdominais ou pélvicas (19). O estadiamento segue os locais mais comuns de metástase, conforme dito anteriormente, e consiste no seguinte: histerectomia total e salpingooforectomia bilateral, podendo-se preservar um anexo e útero em mulheres com desejo de preservação da fertilidade; múltiplas biópsias de peritônio da cavidade pélvica, principalmente em fundo de saco, serosa do reto e bexiga, recesso vésico-uterino e paredes laterais; múltiplas biópsias de peritônio abdominal, principalmente em goteiras parieto-cólicas, omento infracólico, diafragma e qualquer aderência; linfadenectomia pélvica e paraaórtica direita e esquerda; e coleta de lavado peritoneal ou ascite na pelve, goteiras parieto-cólicas e regiões subdiafragmáticas. Em mulheres que não foram submetidas a estadiamento completo, 33 % tiveram diagnóstico de estágio mais grave posteriormente (19). Em relação a estadiamento inicial estágio I, histologicamente bem ou moderadamente diferenciados, mulheres sem prole definida ou com desejo gestacional podem se beneficiar de cirurgia preservadora de fertilidade, procedendo-se salpingooforectomia unilateral ao invés de histerectomia total e salpingooforectomia bilateral com baixa taxa de recorrência e, muitas vezes, com manutenção da função hormonal (20-22).

Baseando-se na origem das diferentes linhagens celulares, os cânceres do ovário são classificados em 3 tipos: epiteliais (85% a 90%), do estroma ovariano (5% a 10%) e de células germinativas (10% a 15%). Há ainda os tumores metastáticos no ovário que compreendem cerca de 5 a 15% de massas ovarianas, sendo mais frequentemente oriundos do trato gastrointestinal, mama e endométrio (23).

A sobrevida das mulheres com carcinoma de ovário depende da extensão da doença ao diagnóstico e do tipo histológico. Os carcinomas de estádios iniciais são geralmente assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos tais como dor leve ou desconforto abdominal, irregularidade menstrual, dispepsia ou outros sintomas digestivos leves (24-27). Os carcinomas de ovário se disseminam para locais como peritônio, omento, órgãos pélvicos e abdominais, diafragma, superfície hepática e pleura por conta de sua drenagem linfática que

através do ligamento redondo drena para ilíacas externas acometendo os linfonodos regionais (ilíaca externa comum, epigástricos, sacrais laterais e paraórticos), além da superfície peritoneal e vasos venosos para cima do diafragma (1). Em cerca de 75% dos casos o carcinoma de ovário é diagnosticado em estádios avançados, e com sobrevida de 30% em 5 anos. Por volta de 15% das mulheres com diagnóstico de carcinoma de ovário apresentam doença localizada com sobrevida de 92% em 5 anos e, até o momento, não existem métodos de rastreamento eficazes para esse tipo de câncer (1,10,24,28).

Os carcinomas ovarianos podem ser classificados em dois grupos, tipo I e tipo II, em relação à sua morfologia e características genético-moleculares (29,30). Os carcinomas do tipo I correspondem aos serosos de baixo grau, endometrióides de baixo grau, células claras, mucinosos, tumores de Brenner e, recentemente adicionado, tumores seromucinosos totalizando 25% dos carcinomas e apenas 10% dos óbitos. São carcinomas de crescimento indolente geralmente detectados confinados ao ovário originados, muitas vezes, de tumores borderline e correspondem a volumosas massas anexiais (23,30,31). A patogênese dos carcinomas serosos do tipo I relaciona-se a migração de células tubáreas que em conjunto denominam-se hiperplasia tubárea papilar (23,31); os carcinomas de células claras e endometrióide relacionam-se a endometriose; quanto aos carcinomas mucinosos e tumores de Brenner estão, provavelmente, relacionados à metaplasia mesotelial mas sua origem permanece controversa (32,33). Carcinomas ovarianos do tipo I relacionam-se com as seguintes mutações em seus genótipos: KRASS, BRAF, ERBB2, PTEN e PIK3CA (31,34).

Os carcinomas do Tipo II correspondem aos serosos de alto grau, endometrióides de alto grau, tumores indiferenciados e carcinosarcomas. Totalizam 75% dos carcinomas ovarianos e 90% dos óbitos. São carcinomas de crescimento rápido, quase sempre bilaterais, geralmente detectados disseminados (32,33). Os carcinomas serosos do Tipo II provavelmente tenham sua origem em células presentes nas fímbrias advindas do denominado carcinoma intraepitelial tubáreo (STIC: *serous tubal intraepithelial carcinoma*). Estão relacionados principalmente com as seguintes mutações em seu genótipo: *p53*, mais de 80% dos casos; *BRCA 1* e *BRCA 2*; e apresentam maior instabilidade genética (30,32,35-37).

## 1.2. Tratamento do Carcinoma de Ovário

O tratamento atual padrão para mulheres com carcinoma de ovário consiste em cirurgia e quimioterapia baseada em platina, principalmente a carboplatina, associado ao paclitaxel (38-43). A carboplatina corresponde a um agente alquilante e é utilizada para tratamento de carcinomas ovarianos, testículo, cabeça e pescoço e pulmão (44) sendo eliminada principalmente pela via renal. Para ser ativada, atravessa a membrana celular através de proteínas transportadoras de cobre 1 (CTR1) e 2 (CTR2) e uma vez dentro da célula, a molécula sofre hidrólise do grupo ligante 1,1-ciclobutanodicarboxilato, dando origem a forma ativa que pode ligar-se a ácidos nucleicos ou proteínas. A atividade antitumoral da carboplatina é atribuída à ligação ao DNA, com a formação de adutos (DNA-platina) inter e intracadeias, que induzem a parada do ciclo celular na fase G2/M e inibição da transcrição e replicação, induzindo apoptose das células tumorais. Apresenta nefrotoxicidade, ototoxicidade e, principalmente, mielotoxicidade. Entretanto a trombocitopenia, causada por mielossupressão, é o efeito adverso que pode limitar a dose da platina (45-47). O paclitaxel é um fármaco precursor da classe de agente estabilizantes de microtúbulos de natureza hidrofóbica, os taxanos. Promove a polimerização da tubulina, fato este que estabiliza os microtúbulos. Dessa forma, o ciclo celular acaba sendo bloqueado na fase G2 e na mitose, impedindo a divisão celular e proliferação das células anti-tumorais (48). O paclitaxel tem como efeitos a mielossupressão (leucopenia e trombocitopenia), oto e nefrotoxicidade, neuropatia periférica, vasodilatação, dificuldade respiratória, letargia e hipotensão, desenvolvimento de reações alérgicas e, a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao fármaco (48,49).

A quimioterapia adjuvante realizada após a cirurgia primária com platina, carboplatina ou cisplatina, e um taxano está indicada para todas as mulheres com carcinoma de ovário exceto aquelas com estágio inicial e baixo grau histológico administrados normalmente segundo o seguinte regime: paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> endovenoso infundidos por 3 horas e carboplatina AUC 5-7.5 endovenosa infundida por 30 a 60 minutos a cada 21 dias por 6 ciclos. Mulheres com baixa performance status podem ser tratadas com somente um quimioterápico, platina ou taxano, semanalmente (4,50). Mulheres com carcinoma de ovário avançado, estádios III e IV, podem ser tratadas com quimioterapia neoadjuvante nos mesmos regimes endovenosos conforme descrito ou realizada prévia a cirurgia intervalar por três ciclos de platina e taxano. A quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia radical citorrredutora demonstrou não inferioridade em relação a cirurgia primária, principalmente em doença extensa e com

possibilidade de cirurgia não ótima com menor morbidade perioperatoria e mortalidade além de melhores taxas de citorredução ótima (4,51,52).

O tratamento cirúrgico deve manter o balanço perfeito entre ser suficientemente agressivo e tentar evitar morbidade desnecessária. Nos últimos anos a laparoscopia tem tido um papel crucial na definição de ressecabilidade, extensão da cirurgia primária e indicação de quimioterapia neoadjuvante (51). Mulheres com diagnóstico de estágio I após estadiamento cirúrgico completo podem não precisar de tratamento adicional (42). Além do estadiamento, o grau histológico representa importância no tratamento por ser um preditor de metástases em relação ao estágio inicial (53). Mulheres com carcinoma de ovário estágio IA ou IB grau 3 além de IC pós cirurgia de estadiamento completo apresentaram maior sobrevida ao receberem quimioterapia adjuvante (54). Ainda em relação ao tratamento de mulheres no estágio I, pode-se avaliar cirurgia preservadora de fertilidade (preservação de útero e anexo contralateral) em mulheres abaixo de 40 anos, doença aparentemente confinada a um dos ovários e bem diferenciados, com bons resultados e sem comprometer as chances de cura (42).

Em mulheres com carcinoma de ovário avançado a cirurgia pélvica radical, ressecção intestinal e cirurgia agressiva em abdômen superior, pode ser necessária para se alcançar uma citorredução ótima além de eliminar células resistentes a quimioterapia. Para que a cirurgia citoredutora seja considerada ótima e tenha benefício em relação a sobrevida, deve haver ausência tumor residual macroscópico (42,55). Em caso de doença avançada e através de exames de imagem, exame clínico ou valores de CA 125 (*Cancer Antigen 125*), deve-se avaliar a extensão da cirurgia para que não se aumente a morbidade pós-operatória em casos com baixa probabilidade de possibilidade de cirurgia ótima (42). Nestes casos torna-se uma opção a quimioterapia neoadjuvante com cirurgia intervalar ou citorredução após quimioterapia completa com resultados de não inferioridade comparados a cirurgia radical inicial (51,52,56,57). Aparentemente mulheres com carcinoma avançado e grande volume de doença tiveram melhor sobrevida tratadas inicialmente com quimioterapia neoadjuvante baseadas em platina do que aquelas submetidas a cirurgia radical primária. Em contrapartida, mulheres com carcinoma de ovário estágio III ou IV e menor volume de doença tiveram melhor sobrevida quando tratadas com cirurgia radical inicialmente (58).

### **1.3. Resistência à Quimioterapia**

Embora 75% das mulheres com carcinoma de ovário apresentem resposta a platina, 25% respondem parcialmente tornando-se resistentes e/ou refratárias. Mulheres com carcinoma



de ovário resistentes à platina apresentam sobrevida livre de progressão em média de 3 a 4 meses e sobrevida global de 12 meses além de baixa taxa de resposta a drogas de segunda escolha (59). É importante conhecer a definição da sensibilidade a platina. Existem quatro categorias de pacientes em relação a resposta platina: 1) refratários: a doença progride na vigência da quimioterapia inicial; 2) resistente: tem progressão da doença nos primeiros seis meses após o término do tratamento inicial (sendo que nesse grupo tem um subgrupo de mulheres que não respondem a nenhum outro tratamento existente); 3) sensível primário: pacientes sem evidência de progressão da doença nos seis meses após o término da quimioterapia ou pacientes com normalização do CA125; ou 50% de diminuição do CA125 (desde que tenha CA125 aumentado no início) por múltiplas linhas de quimioterapia baseada em platina (nesse caso deve se ainda considerar as pacientes parcialmente sensíveis – o tempo livre de recidiva é de 6 a 12 meses e aquelas sensíveis – tempo livre de doença maior que 12 meses após o término do primeiro tratamento com platina); 4) resistência adquirida: pacientes que não respondem mais a platina na doença recidivada, após terem respondido a platina em tratamento anterior. A sensibilidade inicial é inferida se a paciente com doença residual macroscópica após cirurgia não teve progressão por seis meses após o término da quimioterapia e/ou teve uma resposta completa ou maior que 50% para terapia de segunda ou terceira linha (37,60,61).

A platina causa dano no DNA (ácido desoxirribonucleico) após sua entrada na célula e consequentemente o DNA lesionado ativa a cascata de apoptose celular caso não se proceda a correção do dano (59). A resistência a platina é multifatorial e a capacidade de reparo do dano no DNA corresponde a um fator importante para tal resistência (62). Os principais mecanismos que regulam a resistência aos derivados da platina podem ser classificados de acordo com: a alteração em proteínas complexas da membrana celular carreando o quimioterápico para o ambiente intracelular; relacionados com os mecanismos ou vias de reparo ao dano no DNA; de acordo com a atuação nas vias de morte celular programada da célula tumoral ou apoptose referente a via das caspases; e pela não associação diretamente relacionados com a platina, mas com mecanismos intrínsecos de sobrevivência da célula tumoral (59,63). A resistência ao paclitaxel está relacionada principalmente ao aumento da expressão de uma glicoproteína-P de membrana ATP-dependente ABCB1, aumentando o efluxo do quimioterápico nas células e consequentemente menor efeito antineoplásico (64).

Por conta da resistência ao tratamento padrão existe grande esforço para se elucidar o mecanismo e eficácia de terapias alvo como, por exemplo, drogas antiangiogênicas como o bevacizumab, anticorpo monoclonal inibidor do VEGF (*vascular endothelial growth factor*),

este presente em níveis elevados em carcinomas ovarianos; ou inibidores de *Poly Adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase-1* (PARP1), proteína nuclear que atua em via de reparo do DNA via excisão de base, como o Olaparib® (65,66). Estudos recentes demonstram aumento da sobrevida livre de progressão em mulheres com carcinoma de ovário recorrente sensíveis a platina e mulheres com carcinoma de ovário resistentes a platina que foram submetidas a bevacizumab (Avastin®) associado a quimioterapia padrão (67,68). Observou-se aumento expressivo de sobrevida livre de progressão em mulheres tratadas com Olaparib® como terapia de manutenção sendo ainda mais importante em mulheres com mutação BRCA, porém sem evidência de elevação na sobrevida global (69,70).

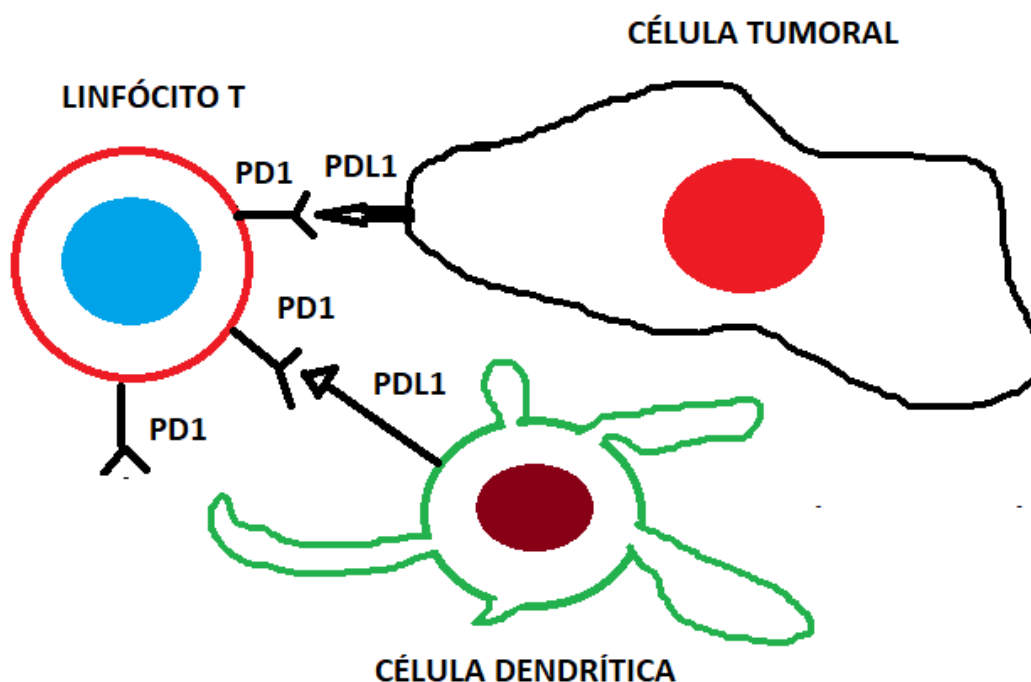
#### 1.4. PD1 (Programmed cell death 1)

Como dito anteriormente, frente a resistência ao tratamento padrão das mulheres com carcinoma de ovário existe uma grande necessidade e oportunidade para melhorar a compreensão dos mecanismos imunológicos e eventualmente desenvolver imunoterapias para este tipo de câncer. Assim tornou-se importante, nos últimos anos, o estudo do sistema e o microambiente imunes dos tumores. O sistema imune é capaz de reconhecer e erradicar células tumorais através de múltiplos e complexos mecanismos (71).

Baseando-se nisso, imunoterapias que utilizam anticorpos inibidores demonstram atualmente elevado potencial para uso clínico (72). Anticorpos monoclonais que bloqueiam a via do receptor PD1 (Programmed cell death 1) como o pembrolizumabe e o nivolumabe apresentam-se como potencial terapia contra câncer renal, pulmonar não pequenas células, melanoma e carcinoma de ovário (73,74). O gene *PDCD1* está localizado no cromossomo 2q37 e codifica uma imunoglobulina transmembrana (membro da família CD28) presente em células T, células B, Linfócitos T Natural Killer, monócitos e células dendríticas e, quando ativada, promove a morte celular programada através de seu receptor tirosina (75,77). O PD1 apresenta dois resíduos de tirosina na região citoplasmática, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) e immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). O PDL1, proteína ligante do PD1, também consiste em uma proteína transmembrana expressa em células T, células B, células dendríticas, células NK, monócitos e macrófagos e células endoteliais (76,77). Pode também estar expresso em células tumorais em câncer de pulmão, cólon, melanoma e ovário (78)

A ligação entre as proteínas PD1 e PDL1 promove a fosforilação do domínio citoplasmático do receptor ITIM e ITSM e, conseqüente recrutamento do Src homology region

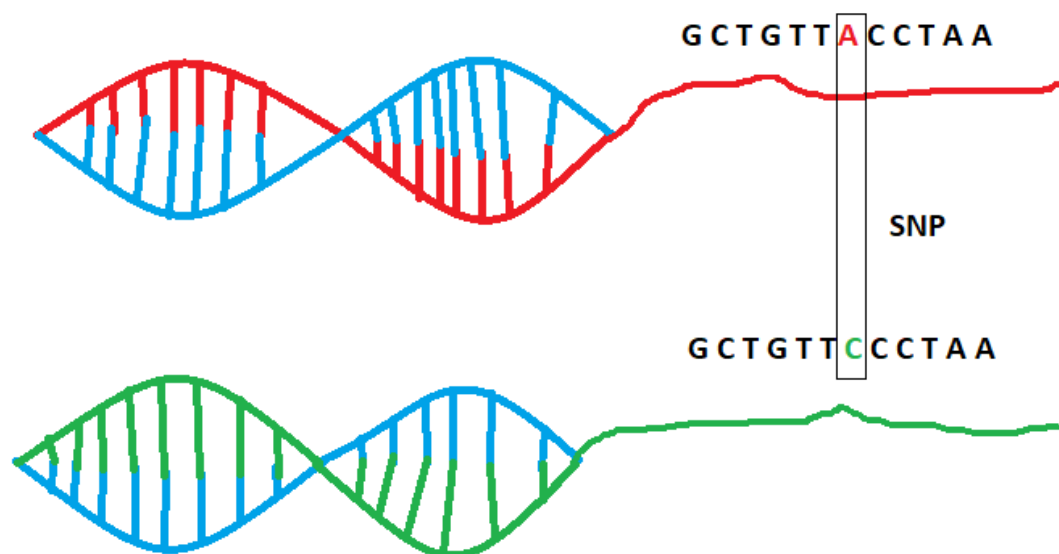
domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) e Src homology region domain-containing phosphatase-2 (SHP-2). Posteriormente há inibição da via do phosphoinositide 3-27 kinase (PI3K) e protein kinase B (PKB) com bloqueio na expressão do Bcl-xl e parada do ciclo celular na fase G1. Reduz-se a proliferação de células T e a produção de citocinas, aumentando assim a possibilidade de apoptose das células relacionadas a resposta imune, tornando-se um sistema auto-regulatório prevenindo uma resposta imune exacerbada (79,80). A produção aumentada de IFN gama (Interferon gama), a qual induz a expressão de PDL1 nas células, cria um feedback que representa uma redução da imunidade anti-tumoral, tornando-se uma via supressora e levando a inativação das células imunes contra o tumor (77,81-85). Este mecanismo encontra-se resumido na **Figura 1**. Sabe-se que células tumorais podem apresentar uma aberrante expressão de PDL1 fazendo com que o microambiente tumoral torne-se resistente ao sistema imune pela presença de linfócitos infiltrados com expressão de PD1 (86). Desde 1991, estuda-se o microambiente tumoral e suas características referentes as células T imunes e expressão de PD1 e PDL1 e, desde então, avalia-se sua relação com sobrevida de mulheres com carcinoma de ovário (83,85,87,88). Em um estudo realizado em Kyoto no Japão em 2011 por Hamanishi e colaboradores (89) demonstrou-se um pior prognóstico em mulheres com carcinoma de ovário do tipo seroso e células claras por maior expressão de PDL1 em microambiente tumoral (89). Já no estudo realizado por Webb e colaboradores (90) no Canadá em 2016 comprovou-se que a expressão de PDL1 estava presente em todos os subtipos histológicos de carcinoma de ovário e que estava expresso principalmente em macrófagos do microambiente tumoral observando-se um prognóstico favorável em concordância com a expressão de PDL1 em mulheres com carcinoma seroso de alto grau. Essa diferença provavelmente se deve ao uso de anticorpos diferentes (90)



**Figura 1:** Mecanismo regulatório simplificado da autoregulação dos linfócitos pelo PD1/PDL1: Ligação entre os receptores transmembranas acarretando em apoptose das células de defesa como mecanismo auto-regulatório e evasão tumoral do sistema imune.

### 1.5. Polimorfismos

Polimorfismos são definidos como a ocorrência regular e simultânea numa única população de cruzamento de dois ou mais genótipos descontínuos com frequência maior do que 1% nesta população. O conceito inclui diferenças de genótipos que variam em tamanho desde um site único de nucleotídeo até sequências de nucleotídeos grandes e visíveis a nível cromossômico. A categoria mais básica de polimorfismo é originada a partir de uma simples mutação, quando ocorre uma troca de um nucleotídeo por outro. Este polimorfismo é conhecido por Single Nucleotide Polymorphism (SNP) também conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (91). Polimorfismos correspondem a alterações no DNA presentes em células germinativas, portanto a avaliação destes é perfeitamente possível através da coleta de sangue periférico com avaliação do DNA dos leucócitos. **(Figura 2)**



**Figura 2:** Exemplo ilustrativo de Polimorfismo de Nucleotídeo Único. A figura acima representa dois segmentos de DNA específicos de indivíduos de uma mesma população. Modificação de uma simples base nitrogenada ocasionando diferenças fenotípicas nos indivíduos define este tipo de polimorfismo.

Atualmente pode-se avaliar polimorfismos gênicos referentes ao PD1 e PDL1 com diferenças em relação ao prognóstico em mulheres com câncer de ovário. Polimorfismos como rs36084323 e rs2227981 do *PDCD1* foram avaliados através de coleta de sangue periférico em relação ao risco de desenvolvimento de carcinoma de ovário e risco de progressão. Demonstrou-se maior risco de desenvolvimento de câncer de ovário quando presentes os polimorfismos em mulheres chinesas porém não se observou diferença em relação a progressão de doença ou sobrevida (92). Torna-se relevante o estudo no momento em que existem dados ainda inconclusivos na literatura relacionando polimorfismos do PD1 com carcinomas de ovário, principalmente em meio à procura de características clínico-patológicas que auxiliem na previsão de resposta ao tratamento, prognóstico e uso de terapia alvo, utilizando-se para isso uma importante via imunológica presente na resposta anti-tumoral. Sasaki e colaboradores (93) avaliaram polimorfismos do PD1 em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células evidenciando diferenças em relação ao prognóstico e risco de desenvolvimento de câncer pulmonar. Os mesmos polimorfismos foram avaliados em relação a mulheres com câncer de mama e observou-se relação entre o polimorfismo rs36084323 e mutação da P53 e consequentemente diferença em relação a prognóstico (94). Lee e colaboradores (95) avaliaram polimorfismos relacionados a PDL1 em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células submetidos a quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. PDL1 rs2297136T>C e rs4143815C>G

aparentemente podem ser usados como preditor de resposta a quimioterapia nestes pacientes (95).

Os polimorfismos PD1.1, PD1.5 e PD1.9 correspondem aos mais estudados atualmente e apresentam maior frequência na população brasileira e foram avaliados em pacientes com melanoma cutâneo por Gomez e colaboradores (96) em relação a fatores prognósticos e risco de melanoma, este comparativamente ao grupo controle. Demonstrou-se associação entre sobrevida e presença dos SNPs PD1.1 e PD1.5 (96). O PD1.1 (c.-606G>A) polimorfismo de nucleotídeo único caracteriza-se por uma substituição G>A na região promotora do gene -606 podendo diminuir a capacidade de transcrição da sequência e assim podendo determinar a redução da produção de PD1 (97). O polimorfismo PD1.5 (c.804C>T) de nucleotídeo único consiste na substituição C>T na posição 804 do exon 5, o que está associado a maior atividade dos linfócitos T apesar de representar uma mutação silenciosa, sem troca de aminoácidos, na posição 268 do PD1 (94,98,99). A substituição C>T na posição 644 do exon 5 caracteriza o polimorfismo de nucleotídeo único PD1.9 (c.644C>T), alterando a estrutura ou função do PD1 pela troca de aminoácidos valina por alanina no domínio extracelular durante a síntese proteica. Essa variante pode corresponder ao aumento da resposta imune (100).

Este estudo foi realizado no Hospital da Mulher da Universidade Estadual de Campinas, local de referência regional e estadual para tratamento e acompanhamento de mulheres com câncer de ovário, e teve como principal objetivo avaliar os polimorfismos rs2227982 (SNP PD1.9), rs2227981 (SNP PD1.5) e rs36084323 (SNP PD1.1) do PD1, por serem os mais estudados e presentes em maior frequência na população em estudo, em mulheres com carcinoma de ovário e relacioná-los com características clínicas e patológicas, sobrevida livre de progressão e sobrevida global, além de resposta ao quimioterapia padrão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

Avaliar a relação dos polimorfismos SNP PD1.1, SNP PD1.5 e SNP PD1.9 do gene *PDCDI* em mulheres com carcinoma de ovário com características clínicas e patológicas, sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

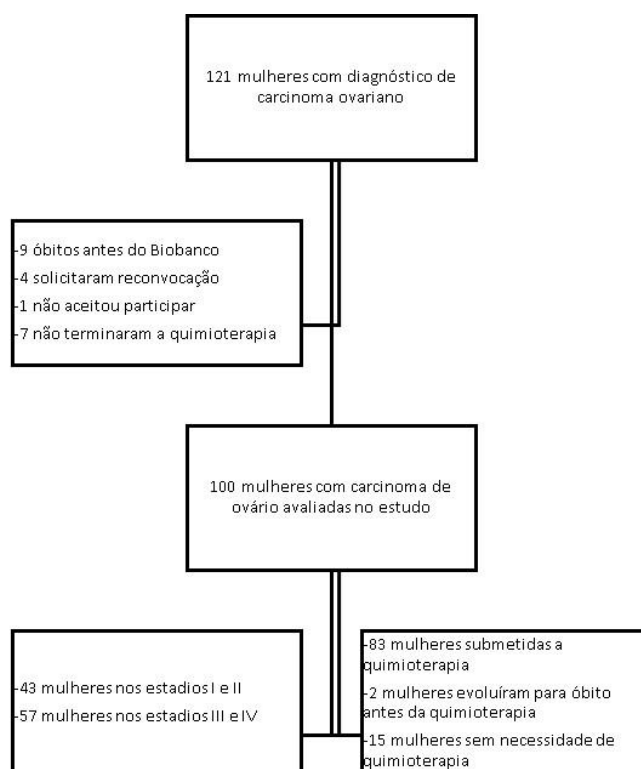
### 2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a distribuição das mulheres com carcinoma de ovário segundo as características clinico-patológicas;
- Avaliar a frequência dos polimorfismos SNP PD1.1, SNP PD1.5 e SNP PD1.9 do gene *PDCDI* em mulheres com carcinoma de ovário;
- Avaliar a associação do polimorfismo PD1.1 SNP c.-606G>A (rs36084323) no gene *PDCDI*, polimorfismo PD1.5 SNP c.804C>T (rs2227981) no gene *PDCDI* e polimorfismo PD1.9 SNP c.644C>T (rs2227982) no gene *PDCDI* com as características clínicas e patológicas e resposta a quimioterapia;
- Avaliar a associação dos polimorfismos PD1.1 SNP c.-606G>A (rs36084323) no gene *PDCDI*, polimorfismo PD1.5 SNP c.804C>T (rs2227981) no gene *PDCDI* e polimorfismo PD1.9 SNP c.644C>T (rs2227982) no gene *PDCDI* com sobrevida livre de progressão e sobrevida global;

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Seleção dos Sujeitos

Um estudo de coorte observacional com coleta prospectiva para o qual foram selecionadas todas as mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma de ovário, um total de 121, atendidas consecutivamente no Hospital da Mulher da Universidade Estadual de Campinas-SP, de janeiro de 2014 a abril de 2018 e seguidas até setembro de 2018. Um total de 107 mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Biobanco-CAISM (056) (**ANEXO 1**) e tiveram sangue periférico coletado. O Biobanco do CAISM – Unicamp foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em maio 2016. O estudo foi aprovado pelo CEP: CAAE: 578293.1.0000.5404 (**ANEXO 2**). Das 21 mulheres excluídas, 9 evoluíram para óbito antes da aprovação do Biobanco pela CONEP; 4 solicitaram reconvocação, 1 não aceitou participar e 7 mulheres não haviam terminado o tratamento quimioterápico ou não foi possível avaliar a resposta ao tratamento. Para avaliação dos polimorfismos, foram incluídas as mulheres tratadas, em tratamento ou sem tratamento prévio maiores de 18 anos com material biológico coletado para o Biobanco do Caism – Unicamp (B-056). O tratamento das mulheres com carcinoma de ovário seguiu o protocolo do CAISM e não sofreu modificações em função do projeto de pesquisa. O fluxograma abaixo demonstra a casuística estudada:





Os dados clínicos das mulheres foram obtidos através dos prontuários médicos e registrados em uma ficha de coleta de dados criada pelo pesquisador (**ANEXO 3**). A idade da paciente foi considerada em anos completos entre a data de nascimento e o momento da primeira consulta no serviço. A etnia foi considerada àquela declarada pela pessoa de acordo com as seguintes opções: branca, preta, amarela, parda ou indígena (101). O estado menopausal foi obtido de dados da história clínica na data da primeira consulta. Considerou-se menopausa intervalo maior que 365 dias da última menstruação em pacientes que apresentaram ao menos uma menstruação durante sua vida. Entre as mulheres previamente hysterectomizadas, aquelas com idade de 50 anos ou mais foram consideradas menopausadas.

Os tipos histológicos dos carcinomas de ovário foram classificados segundo os critérios recentes e preconizados pela OMS (31), e depois reclassificados em Tipo I e II de acordo com a classificação de Kurman e colaboradores (31) e avaliados segundo laudo de anátomo-patológico dos prontuários. O estágio foi classificado de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (18) através do exame clínico, dos exames de imagem, da descrição da cirurgia e do resultado anatomopatológico fornecido pelo patologista após o exame das peças cirúrgicas (18). O nível sérico de CA125 foi obtido pelo teste CA125 II através da técnica de eletroquimiluminescência em analisador automático Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), com valores expressos em unidades por mililitro (U/mL). A cirurgia realizada foi classificada em cirurgia de estadiamento para mulheres com doença restrita ao ovário e citoredutora em mulheres com doença avançada ou localmente avançada. A citorredução foi considerada ótima na ausência de doença residual macroscópica nas mulheres com doença avançada.

A quimioterapia foi realizada de acordo com protocolo já instituído do serviço, incluindo esquemas com carboplatina associada a paclitaxel. Foi avaliado o número de ciclos de quimioterapia, o intervalo entre a cirurgia e o primeiro ciclo e o intervalo médio entre cada ciclo em semanas além do último ciclo. Em relação à resposta à platina, seu tempo foi estimado em meses a partir do término do tratamento primário de quimioterapia baseada em platina até a data da progressão ou recidiva. A resposta em relação à quimioterapia foi definida como (37):

- a) **Refratários:** pacientes que tiveram evidências de progressão da doença durante a quimioterapia ou em até 1 mês após o final deste tratamento, evidenciada por nível sérico persistente e elevado do CA125 ou por progressão clínica;
- b) **Primariamente resistentes:** pacientes que tiveram evidências de progressão da doença em até 6 meses do final da quimioterapia;

- c) **Primariamente sensíveis:** pacientes sem evidências de doença clínica no mínimo 6 meses após o final da quimioterapia ou que apresentaram níveis séricos de CA125 normais em relação aos níveis pré-tratamento (desde que tivessem níveis séricos de CA125 aumentado no início). A sensibilidade pode ser considerada para recidiva posterior a seis meses da quimioterapia primária por múltiplas linhas de tratamento baseadas em platina;
- d) **Resistência adquirida:** mulheres que não responderam mais à platina na doença recidivada, embora tenham previamente apresentado sensibilidade a esta linha de quimioterapia em tratamento anterior.

Para avaliação da resposta foram consideradas as mulheres refratárias como as que progrediram ou recidivaram em vigência de tratamento ou em até um mês após o término da quimioterapia e aquelas que tiveram pelo menos seis meses de seguimento sem recidiva como sensíveis;

A sobrevida livre de progressão (SLP) foi considerada como o tempo, em meses, entre o diagnóstico histológico e a progressão da doença, recidiva ou óbito pela doença baseado nos critérios da *Gynaecological Cancer Inter Group* (GCIG), sendo esta identificada por exame clínico, exames de imagem ou pelos níveis séricos de CA125. A sobrevida global (SG) foi considerada como o tempo, em meses, entre o diagnóstico histológico e a data da última consulta ou óbito, independente do motivo (102).

O poder da amostra do estudo teve como base as frequências dos genótipos de cada polimorfismo gênico nessa população e foi calculado para garantir que os três possíveis genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante) estivessem adequadamente representados. Considerando um erro ao tipo alfa igual a 5 % e erro do tipo beta igual 10 % e uma diferença de frequência de 12-22 %, foi calculado um tamanho amostral de 106 mulheres com carcinoma de ovário.

### 3.2. Análise dos genótipos dos polimorfismos gênicos

O processamento do material biológico e extração foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental, CAISM – UNICAMP. A identificação dos genótipos dos SNPs foi realizada no Laboratório de Genética do Câncer (LAGECA) do Serviço de Oncologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, coordenado pela Profa. Dra. Carmen Silva Passos Lima.

### 3.3. Extração do DNA

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico de mulheres com carcinoma de ovário após assinatura do TCLE do Biobanco (056) utilizando o protocolo de extração de DNA de leucócitos por método de extração com proteinase K, seguido de purificação com fenol e clorofórmio (adaptado de OLERUP e ZETTTERQUIST; 1992).

### 3.4. Processamento do sangue total e obtenção de leucócitos

A amostra de sangue (4.0mL) armazenada em tubo vacutainer com EDTA potássico, foi transferido para tubo falcon de 50mL com auxílio de uma pipeta Pastuer e adicionado 40mL de solução Tris HCl – EDTA 1x (100 mL Tris HCl 1M (pH 7,5 a 8,0) e EDTA 0,5M (pH 8,0); 250µL de Nonidet e 900mL de água ultrapura). Em seguida foi homogenizado no vórtex na amostra e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. Logo após, a lavagem foi repetida com 25mL de Tris HCl – EDTA 1x, homogenizado no vórtex e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão. Quando necessário, a lavagem foi repetida novamente para a obtenção das células brancas sem que houvesse a coloração avermelhada. As células brancas foram ressuspensas em 150µL de Tris HCl – EDTA 1x e colocadas em tubo criogênicos de 1,2mL. Posteriormente, esse sedimento de leucócitos foi armazenado no freezer a -80°C.

### 3.5. Extração do DNA de leucócitos

Foram adicionados 500µL de solução de lise (400µL EDTA 0,5M; 100µL Tris HCl 2M; 40µL NaCl 5M; 500µL SDS 20% e completar para 20mL de água ultra pura e armazenar a 4°C) ao sedimento de leucócitos. Foram misturados no vórtex até o mesmo se desprender do fundo do tubo e em seguida as amostras contendo os leucócitos foram incubadas a 99°C por 10 minutos em banho úmido. Após isso, as amostras foram retiradas do banho úmido e adicionado 10µL de proteinase K (20mg/mL) e logo em seguida foram incubadas no banho úmido a 55°C por 3 horas. As amostras foram homogenizadas por vórtex durante 15 segundos a cada 1 hora de incubação. Após incubação, acrescentou 250µL de fenol e 250µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram misturadas durante 5 minutos na plataforma de balanço e centrifugadas a 13.000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foi removida cuidadosamente a fase superior (aquosa) que contém o DNA e transferido para um novo eppendorf de 2.0mL (a parte orgânica fica embaixo e forma uma “nuvem” na interfase e é

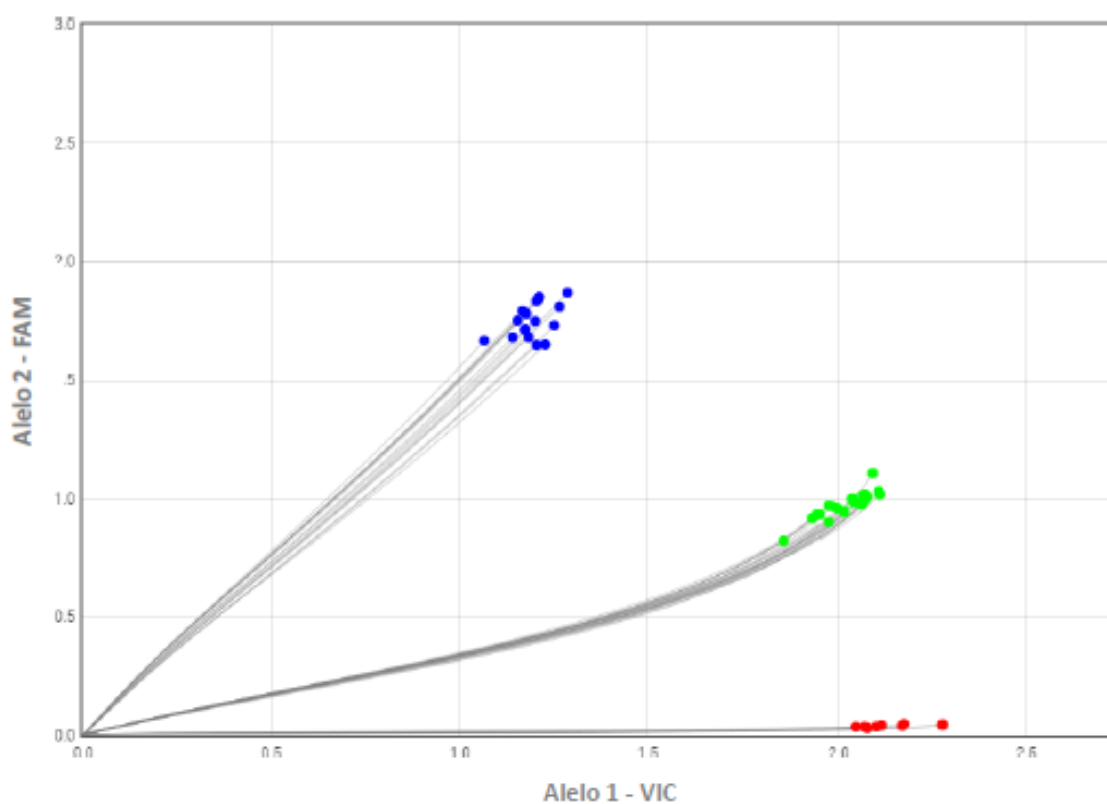
importante ter um cuidado para não pegar essa “nuvem”). Após isso, foi adicionado 500µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturado novamente durante 2 minutos na plataforma de balanço. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e removida cuidadosamente a fase superior (aquosa) que contém o DNA e transferido para um novo eppendorf de 2.0mL. A seguir foi adicionado 30µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1000µL de etanol absoluto gelado e misturados durante 2 minutos na plataforma de balanço. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C overnight. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante a 13.000 rpm e à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado com cuidado por inversão. Adicionou-se 1000µL de etanol 70% gelado, misturados durante 2 minutos na plataforma de balanço e centrifugado novamente a 13.000 rpm, à 4°C por 10 minutos. A seguir, o álcool 70% foi desprezado e as amostras contendo DNA foram secas à 37°C por uma hora (em estufa). Por fim, foram adicionados 50µL de tampão Tris HCl e EDTA (TE) e armazenados em freezer a -20°C.

### 3.6. Identificação dos genótipos dos polimorfismos gênicos

Os genótipos dos SNPs do PD1 foram obtidos por meio da amplificação das regiões de interesse dos genes pela reação em cadeia da polimerase em tempo real usando TaqMan® SNP Genotyping Assays, (Applied Biosystems®, Califórnia, Estados Unidos), com o número de referência do SNPs (rs) do *PDCD1* e o número do ensaio (rs2227981, C\_57931286\_20; rs2227982, C\_57931287\_10; rs36084323, C\_57931321\_10). A PCR foi realizada com 1 µL de DNA de cada mulher na concentração de 50µg/µL, de acordo com o método recomendado pelo fabricante das sondas Taqman®. Foram adicionados ao DNA 0,5µl de SNP Genotyping Assay Mix 1X (dois pares de sondas e dois fluorocromos detectores: FAM® e VIC®), 5µl de TaqMan® Genotyping Master Mix 1X, que contém a AmpliTaqGold® DNA polimerase, deoxynucleotide (dNTP) e tampão com otimizadores da reação e H<sub>2</sub>O (3,5 µL) para um volume final de 10µL. As condições de amplificação consistiram na ativação inicial da AmpliTaq Gold® a 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de incubação a 92 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto.

Controle positivo pertinente (DNA genômico com genótipos já estabelecidos) e controle negativo (água estéril) foram colocados nas reações de genotipagem. Amostras escolhidas aleatórias (10%) foram novamente genotipadas como controle de qualidade do método, com 100% de concordância entre as determinações. As imagens dos genótipos foram analisados pelo software TaqMan Genotyper (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos)

e computadas por dois observadores distintos. A **FIGURA 3** descreve o exemplo das imagens referentes ao resultado das frequências dos genótipos, no caso, o do PD1.5 de nosso estudo. O eixo Y representa a sonda comercial que lê a presença da base C através de fotometria. O eixo X representa a sonda comercial que lê a presença da base T através também de fotometria. Portanto, como a leitura do software é realizada através da intensidade de luz emitida proporcionalmente a concentração das bases específicas, os pontos azuis (números elevados no eixo Y) no caso representam genótipos de mulheres com alta concentração de base C para o determinado polimorfismo, sendo portanto o polimorfismo homozigoto selvagem CC por exemplo.



**Figura 3.** Representação gráfica da distribuição dos três genótipos do polimorfismo SNP PD1.5, analisado pelo TaqMan Genotyper Software (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), após reação de polimerase em cadeia em tempo real. O eixo horizontal X representa o alelo 1 VIC e o eixo vertical Y representa o alelo 2 FAM. Os círculos azul, verde, vermelho representam, respectivamente, os genótipos homozigoto selvagem(CC), heterozigoto(CT) e homozigoto variante(TT). O quadrado preto representa o controle negativo da reação.

### 3.7. ASPECTOS ÉTICOS

Todas as mulheres incluídas neste estudo aceitaram coletar material do componente sólido do sangue, soro e plasma para o Biobanco do CAISM–UNICAMP após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO 1**). O material foi coletado e armazenado no Laboratório de Patologia Experimental (LAPE) do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti. O material concedido é utilizado em pesquisas científicas que obrigatoriamente devem ser enviadas ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP)/UNICAMP para apreciação e liberação de parecer. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE: 578293.1.0000.5404) (**ANEXO 2**). O armazenamento obedece às regras contidas no documento do Biobanco. Somente foram incluídas as mulheres que concordaram que novas pesquisas realizadas com o material biológico concedido e armazenado no Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti FCM/UNICAMP possam ser realizadas sem a necessidade de nova aprovação para uso em cada uma delas, ou seja, com dispensa de novo TCLE para a coleta de dados. Foram seguidas as recomendações do *Guiding Medical Doctors in Biomedical Research Involving Human Subjects*, da declaração de Helsinque (Declaração de Helsinque III, 1997) e da resolução 441/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

### 3.8. ANÁLISE DE DADOS

O teste de verificação do Equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos dos polimorfismos avaliados nos pacientes do estudo. Como foram estudados diferentes SNPs, com diferentes incidências, aplicou-se em cada um deles o cálculo do EHW, sendo o intervalo de confiança de 95%, com o erro tolerado da amostra variando de 20% a 30% da frequência real (**TABELA 1**).

Para comparação das variáveis categóricas aplicou-se teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado ( $\chi^2$ ), enquanto para as variáveis contínuas em mais grupos o teste t foi usado. Para obtenção de variáveis que influenciaram na SLP e SG das mulheres foi aplicada a regressão de Cox, em análise univariada. A metodologia de Kaplan Meier no cálculo da SLP e SG não foi aplicada.

**TABELA 1.** Equilíbrio de Hardy–Weinberg nos *lóci* de polimorfismos estudados

<b>Polimorfismo</b>	<b><math>\chi^2</math>; Valor de <i>P</i></b>
PD1.1 (c.–606G>A) (rs36084323)	0,334; 0,56
PD1.5 (c.804C>T) (rs2227981)	0,114; 0,74
PD1.9 (c.644C>T)(rs2227982)	0,820; 0,37

As amostras de pacientes estiveram em Equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) nos *lóci* do SNPs PD1.1 (c.–606G>A), PD1.5 (c.804C>T), PD1.9 (c.644C>T) (**TABELA 1**). Por conta da frequência baixa dos genótipos homozigotos mutados e a casuística limitada, optamos por realizar a análise estatística unindo genótipos mutados versus genótipos selvagens nos SNP PD1.1 e SNP PD1.9.

Os dados foram analisados através do pacote estatístico R para microcomputadores (<https://www.r-project.org>). O nível de significância assumido, após devidas correções, foi de 5% ( $p < 0,05$  e intervalos de confiança de 95%).

## 4. RESULTADOS

**Artigo: PD1 polymorphism is associated with presence of serous carcinoma, advanced stage and post-surgical residual disease in ovarian carcinoma**

**Guilherme Nogueira Aires<sup>1\*</sup>, Amanda Canato Ferracini<sup>2\*</sup>, Priscila Mazzola<sup>3</sup>, Leisa Lopes Aguiar<sup>4</sup>, Angelo Borsarelli Carvalho Brito<sup>4</sup>, Carmen Silvia Passos Lima<sup>4</sup>, Luis Otávio Sarian<sup>5</sup>, Sophie Derchain<sup>5</sup>**

1 Program in Medical Sciences, Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil

2 Program in Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil

3 Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

4 Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

5 Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil

\*Authors contributed equally



## Abstract

**Objective:** This study aimed to evaluate PD1 polymorphisms in women with ovarian carcinoma and to relate them to clinical and pathological characteristics, progression-free survival and overall survival. **Methods:** A cohort of 100 consecutive women, prospectively attended between January 2014 and April 2018, followed up until September 2018 with a confirmed histological diagnosis of ovarian carcinoma attended at the Women's Hospital of Campinas - São Paulo were included. PD1 SNP genotypes were obtained by amplifying the regions of interest of the genes by the real-time polymerase chain reaction using TaqMan® SNP Genotyping Assays, (Applied Biosystems®, California, United States) under the reference number of the SNPs (rs) of PDCD11 and the assay number (rs2227981, C\_57931286\_20; rs2227982, C\_57931287\_10; rs36084323, C\_57931321\_10). **Results:** Comparing women with type I and type II carcinomas there was a significantly higher proportion of women with advanced carcinoma (84.2% vs 20.9%,  $p < 0.001$ ), higher levels of CA 125 (1452 U/mL vs 661.4 U/mL), a higher proportion of neoadjuvant treatment (62.5% vs 11.1%,  $p < 0.001$ ), higher resistant / refractory rates in relation to response to chemotherapy (54.5% vs 18.5%,  $p < 0.001$ ) among those with type II carcinoma and greater proportion of live with disease / death (77.1% vs 23.2%,  $p < 0.001$ ). The distribution of genotypes of PD1.1 (c.-606G> A) showed no significant difference in relation to clinical aspects. The mean age of women with CC and CT genotype PD1.5 SNP (c.804C> T) was higher than those with TT genotype ( $p = 0.02$ ). There was a significantly higher proportion CC genotype PD1.9 SNP (c.644C> T) in women with serous carcinoma ( $p = 0.01$ ), advanced stage at diagnosis ( $p = 0.01$ ) and post-surgical residual disease ( $p = 0.009$ ) when compared to CT or TT genotypes. No significant association was found among PD1 polymorphism and progression free survival or overall survival. In conclusion, this study demonstrated that PDCD1 gene polymorphisms were associated with serous carcinoma, advance stage and presence of post-surgery residual disease.

**Key-words:** Polymorphisms, Ovarian Carcinoma, Platinum, Survival.

## INTRODUCTION

Ovarian cancer (OC) is currently the fifth leading cause of death due to malignant neoplasms in women (1). Approximately 47% of the deaths secondary to gynecological tumors can be ascribed to OC, which in turn portends the worst prognosis among gynecological malignancies (1-3). Ovarian carcinomas can be classified into two groups, type I and type II, in relation to their morphology and genetic-molecular characteristics (4). The current standard of treatment for women with OC is a combination of surgery with platinum-based chemotherapy, with regimens primarily based on carboplatin and paclitaxel (5-7). Although 75% of women with ovarian carcinoma will respond to platinum-based chemotherapy, 25% respond unsatisfactorily and eventually become resistant and/or refractory to treatment. Women with platinum-resistant ovarian carcinomas have progression-free survival averaging 3 to 4 months and a 12-month overall survival in addition to low second-choice drug response rates (8,9).

The almost universal development of resistance to platinum-based treatments among women with OC highlights the need for a better understanding of the immunological mechanisms involved in OC development and prognosis. Eventually, the acquisition of a solid knowledge basis on the OC-immune system relationships may lead to development of successful treatments for the disease (10). Immunotherapy with inhibitory antibodies currently demonstrate a high potential for clinical use (11). Monoclonal antibodies that block the PD1 (Programmed cell death 1) receptor pathway such as pembrolizumab and nivolumab present as potential therapy against renal, non-small cell lung cancer, melanoma, and ovarian carcinoma (12,13). The binding of PD1 to its ligands promotes a reduction in T cell proliferation and cytokine production, thus increasing the possibility of apoptosis of cells related to immune response, thus becoming a self-regulatory system preventing an exacerbated immune response (14). A feedback is created that represents a reduction of the anti-tumor immunity, becoming a suppressive route and leading to the inactivation of the immune cells against the tumor (13,15-18).

The *PDCD1* gene is located on chromosome 2q37 and encodes a transmembrane immunoglobulin (CD28 family member) present in T cells, B cells, Natural Killer T lymphocytes, monocytes and dendritic cells and, when activated, promotes programmed cell death through its receptor tyrosine (17). Genetic polymorphisms for PD1 can now be evaluated with differences in prognosis in women with ovarian cancer. Polymorphisms are defined as the regular and simultaneous occurrence in a single crossover population of two or more discontinuous genotypes with frequency greater than 1% in this population. The most basic category of polymorphism is originated from a simple mutation, when an exchange of one

nucleotide occurs for another. This polymorphism is known as Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (19). PD1.1 (c.-606G>A) single nucleotide polymorphism is characterized by a G> A substitution in the promoter region of the -606 gene which may decrease the transcription capacity of the sequence and thus may determine the reduction of PD1 production (20). The single nucleotide PD1.5 (c.804C> T) polymorphism consists of the C>T substitution at position 804 of exon 5, which is associated with increased T lymphocyte activity despite representing a silent mutation, with no amino acid substitution, in position 268 of PD1 (21-23). The C>T substitution at position 644 of exon 5 characterizes the single nucleotide polymorphism PD1.9 (c.644C>T), changing the structure or function of PD1 by the exchange of valine amino acids by alanine in the extracellular domain during protein synthesis. This variant may correspond to increased immune response. (24). This study aimed to evaluate the relationship of PD1 polymorphisms in women with OC with clinical and pathological characteristics of the tumor and disease prognosis.

## METHODS

### Study population

This study reports on a cohort of ovarian carcinoma patients, enrolled from January 2014 to April 2018. Data entry was prospective. The study was approved by the local research ethics committee (CAAE: 578293.1.0000.5404) and all women signed the informed consent before being included in the study. All procedures were carried out according to the Helsinki Declaration. The cohort of this study comprised 121 consecutive women, who attended the gynecologic oncology clinics of our institution (Women's Hospital of Campinas State University) between January 2014 and April 2018, followed up through September 2018. All patients had confirmed histological diagnosis of ovarian carcinoma. Fourteen women were not included because they refrained from signing the informed consent term and 7 had not had not completed treatment or could not be classified as responding to chemotherapy. Thus, data from 100 women were considered for analysis. After the signature of the informed consent, 4 ml of peripheral blood were collected from each woman and stored on Biobank number B-056. Clinicopathological data were obtained from the medical records and logged in a data collection form. Tissues were obtained through surgery in 68 women; for 32 women with advanced and clinically irresectable disease, the diagnosis was made through transcutaneous biopsy. Histological subtypes of ovarian carcinomas were classified according to WHO criteria in high grade and low grade serous carcinoma, high grade and low grade mucinous carcinoma, high grade and low grade endometrioid carcinoma, clear-cell carcinoma, undifferentiated

carcinoma and carcinosarcoma (25). Then, cases were classified as either type I (low grade serous, mucinous and endometrioid and clear cell carcinoma) or type II (high grade serous, mucinous, endometrioid, undifferentiated and carcinosarcoma) according to Kurman's classification (26); staging was performed according to the classification by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (27) in stages I to IV; serum CA125 levels were evaluated in UI/ml and were obtained at diagnosis for all cases. The surgery performed was classified as "staging surgery" for women with ovarian restricted disease and as "cytoreductive surgery" for women with advanced disease. Cytoreduction was considered optimal if macroscopic residual disease was absent after the procedure. All women with initial disease and those with optimal surgery were further grouped as "no post-surgical residual disease". Chemotherapy was performed the standards of the study site. Patients receive paclitaxel-carboplatin regimens (28,29). Chemotherapy was prescribed for 83 women. For 15 women with stage Ia disease, chemotherapy was not indicated and two women died before they could start treatment. Patients response to chemotherapy was classified four ways: i) refractory, ii) primary resistant, iii) primary respondent, and iv) acquired resistance (30). Patients in the primary respondent group were restricted to those with progression or at least six months of follow-up without disease. Progression-free survival (PFS) was the time elapsed between the date the histological sample was obtained (either surgery or percutaneous biopsy) to disease progression, relapse or death by the disease; overall survival (OS) was the time elapsed between the date the histological sample was obtained to the date of the last visit or death (regardless of the reason for the death) (31). Data collection for this analysis was interrupted in September 2018.

### **Genotyping**

Genomic DNA was obtained from plasma stored at -70°C, which was extracted from peripheral blood samples. PD1 SNP genotypes were obtained by amplifying the regions of interest of the genes by the real-time polymerase chain reaction using TaqMan® SNP Genotyping Assays, (Applied Biosystems®, California, United States) under the reference number of the SNPs (rs) of PDCD11 and the assay number (rs2227981, C\_57931286\_20; rs2227982, C\_57931287\_10; rs36084323, C\_57931321\_10). Relevant positive control (genomic DNA with already established genotypes) and negative control (sterile water) were placed in the genotyping reactions. Samples randomized (10%) were again genotyped as quality control of the method, with 100% agreement between the determinations. The genotype images were analyzed by the

TaqMan Genotyper software (Applied Biosystems, California, USA) and computed by two different observers.

### Statistical analysis

Significance levels were set at 5%. Data were analyzed using the R Environment for statistical computing (<https://www.r-project.org>). The key clinical and epidemiological factors were compared between patients with Types I and II carcinomas using chi-squares and Fisher's Exact tests were appropriate. Next, we compared the key epidemiological and clinical factors in groups of patients with different CNV genotypes using these same tests or t-tests when examining continuous data. Finally, Cox Proportional Hazards models were fit to compare PFS and OS as related to CNV genotypes.

## RESULTS

The median follow-up was 21 months (range: 20 days - 46 months). By the end of follow-up, 46 women were alive without disease, 30 women were alive with disease and 24 women had died. 49 women progressed or relapsed by September 2018. The median PFS was 13 months (range: 21 days - 38 months) and the median follow-up period for OS patients was 24 months (range: 3 - 46 months).

**Table 1** shows the comparison of clinical and pathological features of the women with either Type I or II OC. The mean age of the women was 61 years (range 24 to 88 years) and most of them were post-menopausal. Women with type I ovarian carcinomas present a mean age lower than those with type II ovarian carcinomas (56.9 vs 62.6,  $p=0.03$ ). There was a significantly higher proportion of women with advanced carcinoma (84.2% vs 20.%,  $p<0.001$ ), higher levels of CA 125 (1452 U/mL vs 661.4 U/mL), and a higher proportion of neoadjuvant treatment (62.5% vs 11.1%,  $p<0.001$ ), higher resistant / refractory rates in relation to response to chemotherapy (54.5% vs 18.5%,  $p<0.001$ ) among those with type II carcinoma and greater proportion of live with disease / death (77.1% vs 23.2%,  $p<0.001$ ).

The polymorphism frequencies of PD1 are shown in **Table 2**. The distributions of women by genotypes of PD1.1 polymorphisms (c.-606G> A), PD1.5 (c.804C> T), PD1.9 (c.644C> T) and clinical pathological aspects are described in **Table 3**. Hardy-Weinberg Equilibrium in were: PD1.1 (c.-606G> A) (rs36084323) ( $\chi^2 = 0.334$ ,  $p = 0.56$ ), PD1.5 (c.804C> T) (rs2227982) ( $\chi^2 = 0.820$ ,  $p = 0.37$ ), PD1.9 (c.644C> T). Because of the low frequency of mutated homozygous genotypes and limited casuistry, we chose to perform statistical analysis by linking mutated genotypes versus wild genotypes in PD1.1 and PD1.9 SNPs. The distribution of genotypes of

PD1.1 (c.-606G> A) showed no significant difference in relation to clinical characteristics. The mean age of women with CC and CT genotype PD1.5 SNP (c.804C> T) was higher than that for women the with TT genotype ( $p = 0.02$ ). There was a significantly higher proportion of women with CC genotype PD1.9 SNP (c.644C> T) with serus carcinoma ( $p = 0.01$ ), advanced stage at diagnosis ( $p = 0.01$ ) and post-surgical residual disease ( $p = 0.009$ ) when compared to CT or TT genotypes.

**Table 4** presents a univariate Cox analysis of pathological clinical aspects and polymorphisms according to survival. Women with type II carcinoma present a HR=3.8 (95% CI 1.7 - 8.3) for progression to the disease compared to women with type I carcinoma. Women at the advanced stage have a HR=4.4 (95% CI 2.0 - 9.5) to progress through the disease in relation to women in stage I / II. Women with post-surgical residual disease presented a HR=4.2 (95% CI 2.0 - 8.9) and HR=6.0 (95% CI 1.7 - 20.0) for progression and death respectively for the disease in relation to women without residual disease. PFS and OS were also associated in women who underwent chemotherapy treatment (HR: 2.3 and 95% CI 1.3 - 4.3; HR=3.6 and 95% CI 1.4 - 9.2) and in women who were resistant / refractory to treatment based on platinum (HR=5.8 and IC 95% 3.0 - 11.2; HR=5.9 and IC 95% 2.1 - 16.2). No significant association was found among PD1 polymorphism and PFS or OS.

## DISCUSSION

In this study, PD1 polymorphisms were evaluated in women with ovarian carcinoma in order to analyze their association with pathological and clinical aspects of the disease, response to chemotherapy and progression-free and / or overall survival. The frequencies of these polymorphisms were analyzed in women who may benefit from chemotherapy with carboplatin and paclitaxel. . In the present study, comparing women with type I and type II carcinomas, there was a significantly higher proportion of women with advanced carcinoma, higher levels of CA 125, a higher proportion of neoadjuvant treatment, a higher resistant / refractory rates in relation to response to chemotherapy and greater proportion of live with disease / death among those with type II carcinoma. Women with type II carcinoma, advanced disease, post-surgical residual disease, need for neoadjuvant therapy, resistance to carboplatin and paclitaxel had a higher risk of progression and death compared to those with type I carcinoma, early stage disease, no post-surgical residual disease, absence of neoadjuvant therapy and sensitivity to carboplatin and paclitaxel.

The frequencies of PD1.1 (c.-606G> A), PD1.5 (c.804C> T), PD1.9 (c.644C> T) SNP genotypes are highly variable among ethnicities (22,32,33). Gomez et al. (34) found a

distribution of *PDCDI* genotypes similar to this study in Brazilian individuals with cutaneous melanoma. The PD1.1 (c.-606G> A), PD1.9 (c.644C> T) SNPs presented a number of women with the AA and TT genotypes, respectively, quite limited ( $n = 1$ ) and were pooled to the heterozygote (32,34). Although it is not described in the study variables, the woman who presented the AA and TT genotype is of Asian ethnicity, ethnic group in which these genotypes are more prevalent (33).

The distribution of genotypes of PD1.1 (c.-606G> A) showed no significant difference in relation to clinical aspects. The mean age of women with CC and CT genotype PD1.5 SNP (c.804C> T) was higher than that of women with TT genotype. There was a significantly higher proportion of the CC genotype PD1.9 SNP (c.644C> T) in women with serous carcinoma, advanced stage at diagnosis and post-surgical residual disease when compared to CT or TT genotypes. No significant association was found between the PD1 polymorphism and progression free survival or overall survival.

Regarding the PD1.5 SNP (c.804C> T), the mean age of women with CC and CT genotypes was higher than that of women with the TT genotype ( $p = 0.02$ ). The presence of the T allele in the SNP PD1.5 polymorphism (c.804C> T) probably elevates lymphocyte activity by altering the expression of the *PDCDI* gene and, consequently, increased tumor destruction. Although it is a silent mutation, that is, without an amino acid exchange in the constitution of the final protein, this SNP possibly leads to imbalance in the relation between other polymorphisms causing it to be linked to the alteration in the immune response of some types of cancer and diseases autoimmune diseases (21,22,33). Perhaps the TT genotype would be expected in older women because of the better immune response to the tumor and consequently the later onset of the cancer. In the study by Gomez et al. (34), no association of this SNP was found with age, despite the high number of individuals included. The TT genotype was related to a reduction in the risk of ovarian and non-small cell lung cancer, however the CC genotype was related to an increased risk of breast cancer and central nervous system tumors (22,35)

There was a significantly higher proportion of women with serous carcinoma, advanced stage and postoperative residual disease with CC genotype of PD1.9 (c.644C> T) when compared to CT or TT genotype, demonstrating perhaps a protective character in this sense in relation to the polymorphic allele referring to extensive disease at diagnosis. However, the number of patients with the PD1.9 TT genotype (c.644C> T) in this study was very limited ( $n = 1$ ) and therefore this result should be viewed with caution. The PD1.9 SNP corresponds to the change of the amino acid Valine by the Alanine altering the structure of the protein and being able to alter its function. The TT genotype of the PD1.9 SNP is related to a better

antitumor immune response (24), which corroborates the findings of Ren et al. (36) concerning the lower risk of breast cancer in women with this genotype. Moreover, additional studies are needed to elucidate the consequences of this SNP on the encoded protein (22).

The response to chemotherapy was correlated with the SNPs of the *PDCD1* gene and no significant association was found. Studies have evaluated the risk of developing different cancers with SNPs in the *PDCD1* gene. In a study conducted in Nagoya in Japan by Sasaki et al. (32) PD1.1 SNP (c.-606G>A) was evaluated in patients with non-small cell lung cancer. The homozygous genotype AA variant, heterozygous GA and GG wild homozygote were identified in 25%, 50% and 25%, respectively. There was an increased risk of developing lung cancer in the AA genotype. Hua et al. (22) observed that G1 genotype of PD1.1 SNP (c.-606G>A) was associated with lower risk for breast cancer. Li et al. (33) evaluated PD1.1 (c.-606G>A) and PD1.5 (c.804C> T) SNPs in relation to the risk of developing ovarian carcinoma. Compared to the AA genotype of PD1.1 SNP (c.-606G> A), the AG and GG genotypes may significantly decrease the risk of developing ovarian carcinoma (OR = 0.71, 95% CI = 0.54-0.94, OR = 0.68, 95% CI = 0.50-0.94, respectively). Compared with women of C alleles, T allele carriers had a significantly lower risk of developing ovarian carcinoma (OR = 0.82, 95% CI = 0.69-0.98) in the PD1.5 SNP (c. 804C> T).

In the present study, no significant associations were observed regarding PFS and OS with SNPs in the *PDCD1* gene, similar to the study by Li et al. (33). However, Sasaki et al. (2014) have observed that the PD1.1 (c.-606G> A) polymorphism may be a marker for the progression of non-small cell lung cancer. The study disclosed that this association may be related to higher frequencies of the AA genotype and the A allele in PD-1.1 (c.-606G> A) in p53 positive cases. Survival analysis needs to be performed in future studies with women with ovarian carcinoma in various parts of the world.

The strengths of our study are the analysis of *PDCD1* polymorphisms in response to chemotherapy in a consecutive series of prospectively treated cases in a single service, treated uniformly and with inclusion of all subtypes in addition to various stages. The various studies related ovarian cancer reinforce the idea that the different histological subtypes of ovarian cancer correspond to different diseases that should be studied and treated differently (26,37-39). Most women with ovarian carcinoma have type II disease, in which a significant association was found with more advanced stages, higher levels of CA125 and presence of post-surgery residual disease, data consistent with the literature (25,39). As limitation we can mention the small number of patients and short interval time of follow-up. Follow up studies with a larger sample size are still required. In conclusion, this study demonstrated that *PDCD1*



gene polymorphisms are associated with serous carcinoma, advance stage and presence of post-surgery residual disease but did not influence response to chemotherapy, progression-free survival or overall survival.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) number 306583/2014-3 and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2018/00070-2 and number 2016/07822-4 funded this study.

#### CONFLICT OF INTEREST

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Ferlay, J. et al. Globocan 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; v.1, n.11, 2013. Disponível: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 20 mar 2016.
2. Berek, J. S.; Crum, C.; Friedlander, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 119 Suppl 2:S118-29 2012.
3. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v.66, n.1, p.7-30, 2016.
4. Shih, I. E. M.; Kurman, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology*, v.164, n.5, p.1511-8, 2004.
5. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(17):1320-9.
6. Schorge JO, Eisenhauer EE, Chi DS. Current surgical management of ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26(1):93-109.
7. Mills K, Fuh K. Recent Advances in Understanding, Diagnosing, and Treating Ovarian Cancer. *F1000Res*. 2017;6:84.
8. Thigpen T. A rational approach to the management of recurrent or persistent ovarian carcinoma. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55(1):114-30.
9. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*. 2014;133(3):624-31.
10. Zhu X, Lang J. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2016;142(1):184-9
11. Ascierto PA, Addeo R, Cartenì G, Daniele B, De Laurentis M, Ianniello GP, et al. The role of immunotherapy in solid tumors: report from the Campania Society of Oncology Immunotherapy (SCITO) meeting, Naples 2014. *J Transl Med*. 2014;12:291.
12. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.

13. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(34):4015-22.
14. Gaillard SL, Secord AA, Monk B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2016;3:11
15. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet*. 2015;386(9990):249-57.
16. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
17. Gianhecchi E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(11):1091-100.
18. Maine CJ, Aziz NH, Chatterjee J, Hayford C, Brewig N, Whilding L, et al. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(3):215-24.
19. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(6):593-601
20. de Vooght KM, van Solinge WW. Gene promoter analysis in molecular diagnostics: do or don't? *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(5):403-5.
21. Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, et al. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):770-5.
22. Hua Z, Li D, Xiang G, Xu F, Jie G, Fu Z, et al. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(1):195-201.
23. Mojtahedi Z, Mohmedi M, Rahimifar S, Erfani N, Hosseini SV, Ghaderi A. Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene*. 2012;508(2):229-32.

24. Qiu H, Zheng L, Tang W, Yin P, Cheng F, Wang L. Programmed death-1 (PD-1) polymorphisms in Chinese patients with esophageal cancer. *Clin Biochem.* 2014;47(7-8):612-7.
25. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. ed 4. Lyon, France, IARC, 2014.
26. Lambrechts S, Lambrechts D, Despierre E, Van Nieuwenhuysen E, Smeets D, Debruyne PR, et al. Genetic variability in drug transport, metabolism or DNA repair affecting toxicity of chemotherapy in ovarian cancer. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2015;16:2.
27. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 2014;133(3):401-4.
28. Bell J, Brady MF, Young RC, Lage J, Walker JL, Look KY, et al. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2006;102(3):432-9.
29. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0. [Cited 2018, April 22]. Available from: <[https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf)>. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines. Available at <http://www.nccn.org>.
30. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature.* 2015;521(7553):489-94.
31. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(2):419-23
32. Sasaki H, Tatematsu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):1035-42
33. Li Y, Zhang HL, Kang S, Zhou RM, Wang N. The effect of polymorphisms in PD-1 gene on the risk of epithelial ovarian cancer and patients' outcomes. *Gynecol Oncol.* 2017;144(1):140-5.

34. Gomez GVB, Rinck-Junior JA, Oliveira C, Silva DHL, Mamoni RL, Lourenço GJ, et al. PDCD1 gene polymorphisms as regulators of T-lymphocyte activity in cutaneous melanoma risk and prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31(2):308-17.
35. Zhang J, Zhao T, Xu C, Huang J, Yu H. The association between polymorphisms in the PDCD1 gene and the risk of cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(40):e4423.
36. Ren HT, Li YM, Wang XJ, Kang HF, Jin TB, Ma XB, et al. PD-1 rs2227982 Polymorphism Is Associated With the Decreased Risk of Breast Cancer in Northwest Chinese Women: A Hospital-Based Observational Study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(21):e3760.
37. Ferrero A, Fuso L, Tripodi E, Tana R, Daniele A, Zanfagnin V, et al. Ovarian Cancer in Elderly Patients: Patterns of Care and Treatment Outcomes According to Age and Modified Frailty Index. *Int J Gynecol Cancer.* 2017;27(9):1863-1871
38. Sallum LF, Andrade L, Ramalho S, Ferracini AC, de Andrade Natal R, Brito ABC, et al. WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis. *Oncotarget.* 2018a;9(22):15818-15827.
39. Sallum LF, Andrade L, Bastos Eloy da Costa L, Ramalho S, Ferracini AC, Natal RA, et al. BRCA1, Ki67, and  $\beta$ -Catenin Immunoexpression Is Not Related to Differentiation, Platinum Response, or Prognosis in Women With Low- and High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2018b;28(3):437-447

## TABLES

**Table 1: Clinical aspects of women with type I and type II carcinoma**

Variables	Type I n (%) n=43	Type II n (%) n=57	<i>p</i>
<b>Age</b>			
Average (SD)	56.9 (15.9)	62.6 (11.4)	<b>0.03</b>
<b>Etnia</b>			
White	40 (93.0)	52 (91.2)	0.1
Black/Brown	3 (7.0)	5 (8.8)	
<b>Menopause</b>			
Yes	31 (72.0)	46 (80.7)	0.59
No	12 (28.0)	11 (19.3)	
<b>Histologic Type<sup>§</sup></b>			
Others	36 (83.7)	9 (15.7)	<b>&lt;0.001</b>
Serous	7 (16.2)	48 (84.2)	
<b>Stage</b>			
I/II	34 (79.0)	9 (15.7)	<b>&lt;0.001</b>
III/IV	9 (21.0)	48 (84.3)	
<b>Ca125 (U/mL)</b>			
Average (SD)	661.4 (1684.9)	1452 (3069.0)	<b>0.0029</b>
<b>Post-surgical residual disease / diagnosis</b>			
No	36 (83.7)	12 (21.0)	<b>&lt;0.001</b>
Yes	7 (16.2)	45 (79.0)	
<b>Chemotherapy *</b>			
Adjuvant	24 (88.8)	21 (37.5)	<b>&lt;0.001</b>
Neoadjuvant	3 (11.2)	35 (62.5)	
<b>Platinum Response*</b>			
Primary sensitive/Acquired resistance	23 (81.4)	25 (45.4)	<b>&lt;0.001</b>
Primary resistant/Refractory	5 (18.6)	30 (54.6)	
<b>Status</b>			
Live without disease	33 (76.7)	13 (22.8)	<b>&lt;0.001</b>
Live with disease/Death	10 (23.3)	44 (77.2)	

SD: standard deviation § Serous carcinoma: Serous carcinomas of low grade 6 (11.0%) and serous carcinomas of high grade 49 (89.0%); Others: 3 (6.7%) undifferentiated, 5 (11.2%) mixed , and 11 (24.4%) cases of clear cell carcinomas, 8 (17.8%) endometrioids, 15 (33.3%) mucinous, 2 (4.4%) carcinosarcomas and 1 (2.2%) small cell carcinoma; \* 83 women presented the course for neoadjuvant or adjuvant chemotherapy;

**Table 2: The frequencies of polymorphisms of PD1**

<b>Genotype - n (%)</b>	SNP PD1.1	SNP PD1.5	SNP PD1.9
	<b>GG - 86(86%)</b>	<b>CC - 28(28%)</b>	<b>CC - 88(88%)</b>
	<b>GA - 13(13%)</b>	<b>CT - 50(50%)</b>	<b>CT - 11(11%)</b>
	<b>AA - 1(1%)</b>	<b>TT - 22(22%)</b>	<b>TT - 1(1%)</b>

**Table 3: Frequencies of genotypes of PDCD1 polymorphisms in women with ovarian carcinoma and clinical pathological aspects**

Variables	PD1.1 (c.-606G>A)		<i>p</i>	PD1.5 (c.804C>T)			<i>p</i>	PD1.9 (c.644C>T)		<i>p</i>
	n (%)			n (%)				n (%)		
	GG	GA+AA		CC	CT	TT		CC	CT + TT	
n (%)	86 (86.0)	14 (14.0)		28 (28.0)	50 (50.0)	22 (22.0)		88 (88.0)	12 (12.0)	
<b>Age</b>										
Average (SD)	59.0 (14.0)	61.0 (12.2)	0.63	64.0 (11.9)	60.3 (12.4)	53.0 (17.1)	<b>0.02</b>	59.7 (13.9)	60.8 (12.8)	0.80
<b>Etnia</b>										
White	79 (91.8)	13 (92.8)	0.68	25 (89.2)	48 (96.0)	19 (86.4)	0.3	81 (92.0)	11 (91.6)	0.65
Brown/Black	7 (8.2)	7 (7.2)		3 (10.8)	2 (4.0)	3 (13.6)		7 (8.0)	1 (8.4)	
<b>Menopause</b>										
Yes	67 (77.9)	10 (71.4)	0.40	24 (85.7)	38 (76.0)	15 (68.2)	0.3	68 (78.4)	8 (66.7)	0.28
No	19 (22.1)	4 (28.6)		4 (14.8)	12 (24.0)	7 (31.8)		19 (21.5)	4 (33.3)	
<b>Histologic Type<sup>§</sup></b>										
Others	38 (44.1)	7 (50.0)	0.45	12 (42.8)	21 (42.0)	12 (54.5)	0.59	34 (38.6)	9 (75.0)	<b>0.01</b>
Serous	48 (55.9)	7 (50.0)		16 (57.2)	30 (58.0)	10 (45.5)		54 (61.4)	3 (25.0)	
<b>Subtype</b>										
Type I	34 (39.5)	9 (64.2)	0.07	14 (50.0)	18 (36.0)	11 (50.0)	0.36	39 (44.3)	6 (64.3)	0.47
Type II	52 (60.5)	5 (35.8)		14 (50.0)	32 (64.0)	11 (50.0)		49 (55.7)	6 (35.7)	
<b>Stage</b>										
I/II	34 (39.5)	9 (64.2)	0.07	14 (50.0)	18 (36.0)	11 (50.0)	0.36	34 (38.6)	9 (75.0)	<b>0.01</b>
III/IV	52 (60.5)	5 (35.8)		14 (50.0)	32 (64.0)	11 (50.0)		54 (61.4)	3 (25.0)	
<b>CA125</b>										
Average (SD)	1133 (2713)	982 (2017)	0.84	759 (1497)	1394 (3349)	919 (1908)	0.56	1119 (2685)	1064 (2149)	0.94

SD: standard deviation; § Serous carcinoma: Serous carcinomas of low grade 6 (11.0%) and serous carcinomas of high grade 49 (89.0%); Others: 3 (6.7%) undifferentiated, 5 (11.2%) mixed , and 11 (24.4%) cases of clear cell carcinomas, 8 (17.8%) endometrioids, 15 (33.3%) mucinous, 2 (4.4%) carcinosarcomas and 1 (2.2%) small cell carcinoma;

\* 83 women presented the course for neoadjuvant or adjuvant chemotherapy;



**Table 3: Frequencies of genotypes of PDCD1 polymorphisms in women with ovarian carcinoma and clinical pathological aspects (continuation)**

Variáveis	PD1.1 (c.-606G>A)		<i>p</i>	PD1.5 (c.804C>T)			<i>p</i>	PD1.9 (c.644C>T)		<i>p</i>
	n (%)			n (%)				n (%)		
	GG	GA ou AA		CC	CT	TT		CC	CT ou TT	
n (%)	86 (86.0)	14 (14.0)		28 (28.0)	50 (50.0)	22 (22.0)		88 (88.0)	12 (12.0)	
Post-surgical residual disease / diagnosis										
No	38 (44.1)	10 (71.4)	0.10	16 (57.2)	19 (38.0)	13 (59.1)	0.13	38 (43.2)	10 (83.3)	0.009
Yes	48 (55.9)	4 (21.6)		12 (42.8)	31 (62.0)	9 (40.9)		50 (56.8)	2 (16.7)	
Chemotherapy #										
Adjuvant	39 (53.5)	6 (60.0)	0.48	11 (52.3)	23 (50.0)	11 (68.7)	0.42	39 (52.0)	6 (70.0)	0.19
Neoadjuvant	34 (46.5)	4 (40.0)		10 (47.7)	23 (50.0)	5 (31.3)		36 (48.0)	2 (30.0)	
Platinum Response*										
Primary sensitive/Acquired resistance	44 (61.1)	3 (30.0)	0.06	9 (42.8)	27 (60.0)	12 (68.7)	0.24	44 (59.4)	3 (37.5)	0.27
Primary resistant/Refractory	29 (38.9)	7 (70.0)		12 (57.2)	18 (40.0)	5 (31.3)		31 (40.6)	5 (62.5)	
Status										
Live without disease	39 (45.4)	7 (50.0)	0.48	11 (39.2)	22 (44.0)	13 (59.0)	0.34	39 (44.3)	7 (58.3)	0.28
Live with disease/Death	47 (54.6)	7 (50.0)		17 (60.8)	28 (56.0)	9 (41.0)		49 (55.7)	5 (41.7)	

SD: standard deviation; § Serous carcinoma: Serous carcinomas of low grade 6 (11.0%) and serous carcinomas of high grade 49 (89.0%); Others: 3 (6.7%) undifferentiated, 5 (11.2%) mixed, and 11 (24.4%) cases of clear cell carcinomas, 8 (17.8%) endometrioids, 15 (33.3%) mucinous, 2 (4.4%) carcinosarcomas and 1 (2.2%) small cell carcinoma;

\* 83 women presented the course for neoadjuvant or adjuvant chemotherapy;

**Table 4: Clinical aspects with survival in the univariate Cox analysis**

Progression Survival			Overall Survival	
	<i>p</i>	HR (IC: 95%)	<i>p</i>	HR (IC: 95%)
<b>Age</b>		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
Average (SD)	0.03	1.0 (0.9 - 1.5)	0.6	1.0 (0.9 - 1.0)
<b>Histologic Type<sup>§</sup></b>				
Others		<b>Reference</b>	0.28	<b>Reference</b>
Serous	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.1 (1.5 - 6.1)</b>		1.53 (0.4 - 1.5)
<b>Subtype</b>				
Type I		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
Type II	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.8 (1.7 - 8.3)</b>	0.20	1.82 (0.7 - 4.5)
<b>Stage</b>				
I/II		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
III/IV	<b>&lt;0.001</b>	<b>4.4 (2.0 - 9.5)</b>	<b>0.01</b>	<b>3.6 (1.2 - 10.7)</b>
<b>CA125</b>				
Average (SD)	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.8 (1.18 - 12.0)</b>	0.25	1.69 (0.6 - 5.6)
<b>Post-surgical residual disease / diagnosis</b>				
No	<b>&lt;0.001</b>	<b>Reference</b>	0.8	<b>Reference</b>
Yes		<b>4.2 (2.0 - 8.9)</b>		6.0 (1.7 - 20.0)
<b>Chemoterapy<sup>#</sup></b>		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
Adjuvant	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.3 (1.3 - 4.3)</b>	<b>0.007</b>	<b>3.6 (1.4 - 9.2)</b>
Neoadjuvant				
<b>Platinum Response*</b>				
Primary sensitive/Acquired resistance		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
		<b>5.8 (3.0 - 11.2)</b>		
Primary resistant/Refractory	<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>	<b>5.9 (2.1 - 16.2)</b>
<b>PD1.1 (c.-606G&gt;A)</b>				
GG		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
GA ou AA	0.99	-	0.99	-
<b>PD1.5 (c.804C&gt;T)</b>				
CC		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
CT	0.95	0.98 (1.0 - 1.8)	0.65	0.80 (0.31-2.08)
TT	0.49	0.73 (1.3 - 1.8)	0.53	0.65 (1.54 - 2.52)
<b>PD1.9 c.644C&gt;T</b>				
CC		<b>Reference</b>		<b>Reference</b>
CT ou TT	0.99	-	0.99	-

SD: standard deviation; § Serous carcinoma: Serous carcinomas of low grade 6 (11.0%) and serous carcinomas of high grade 49 (89.0%); Others: 3 (6.7%) undifferentiated, 5 (11.2%) mixed , and 11 (24.4%) cases of clear cell carcinomas, 8 (17.8%) endometrioids, 15 (33.3%) mucinous, 2 (4.4%) carcinosarcomas and 1 (2.2%) small cell carcinoma; \* 83 women presented the course for neoadjuvant or adjuvant chemotherapy;

## 5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram avaliados alguns polimorfismos do PD1, proteína que age como receptor de membrana celular responsável indiretamente pela resposta imune ao tumor, a fim de associá-los com os aspectos clínico patológicos, resposta à quimioterapia e sobrevida livre de progressão e/ou global em mulheres com carcinoma de ovário. Optou-se por investigar a frequência desses polimorfismos num grupo de mulheres que poderão se beneficiar com o tratamento com derivados da carboplatina e paclitaxel. Entre as 100 mulheres incluídas no estudo, a média de idade foi de 61 anos, semelhantes aos estudos recentemente realizados (103,104). A maioria das mulheres apresentava etnia branca (auto-declarada) e menopausadas (105-107).

Os diversos estudos relacionados com esse tipo de câncer reforçam a idéia de que os diferentes subtipos histológicos do câncer de ovário correspondem a diferentes doenças que deveriam ser estudadas e tratadas de forma distinta (31). Atualmente os carcinomas de ovário são subdivididos em dois grandes grupos, sendo eles: tipo I, que compreendem cânceres seroso de baixo grau, de células claras, endometrióides, cuja origem provavelmente deriva de endometriose; e tipo II, que compreende os tumores serosos de alto grau e indiferenciados cuja origem provável é através da transformação maligna de epitélio tubário atípico – *serous tubario atypical cell*. A maioria das mulheres com carcinoma de ovário tipo II apresenta estádios mais avançados, maiores níveis de CA125 e com presença de doença residual pós cirurgia, dados condizentes com a literatura (31,107). As recomendações para a realização de quimioterapia baseada em carboplatina e paclitaxel em mulheres com carcinoma de ovário dependem do estágio, grau e tipo histológico. Mulheres em estágio I e grau I não são tratadas com quimioterapia adjuvante após a cirurgia. No presente estudo, 15% das mulheres não tiveram indicação de quimioterapia. Mulheres com carcinomas indiferenciados (grau II ou superior) e/ou tipos histológicos com seroso de alto grau e carcinoma de células claras são submetidas à quimioterapia à base de platina sistêmica (4). Comparando mulheres com carcinoma tipo I e tipo II houve uma proporção significativamente maior de mulheres que realizaram tratamento neoadjuvante (11,1% vs 62,5%,  $p < 0,001$ ) entre aquelas com carcinoma tipo II. Esse tipo tratamento consiste em realizar a quimioterapia com carboplatina e paclitaxel antes da cirurgia seguida por citorredução cirúrgica intervalada (isto é, entre ciclos de quimioterapia) e quimioterapia adicional pós-cirurgia (108). Esse tratamento é uma alternativa, especialmente para mulheres em estádios avançados sem a possibilidade de cirurgia inicial devido a uma massa abdominal muito extensa para a ressecção completa. Dois estudos demonstraram resultados entre cirurgia de primeira linha com quimioterapia adjuvante em comparação com a

quimioterapia neoadjuvante, seguida por cirurgia e quimioterapia pós-operatória, e os desfechos foram semelhantes na sobrevida livre de progressão e sobrevida global entre o grupo de mulheres (51,52). A resposta resistência/refratária à platina foi significativamente maior em mulheres com tipo II e estiveram associadas no grupo incluído neste trabalho (54,5% vs 18,5%,  $p < 0,001$ ). A recidiva ou progressão é o principal fator prognóstico e o que determina a sensibilidade ou resistência do tumor, sendo a resistência à platina o fator mais importante de pior prognóstico (1). Os carcinomas tipos II, principalmente carcinoma seroso de alto grau, caracterizaram-se por quimiossensibilidade inicial notável a terapia baseada em platina, porém, a maioria das mulheres neste estudo desenvolveu uma resistência progressiva à quimioterapia durante o tratamento ou seis meses após o término no tratamento primário.

Como citado anteriormente, este estudo também avaliou a correlação dos aspectos clínicos-patológicos com polimorfismos do gene *PDCD1* e, concomitantemente, a combinação destes polimorfismos e sobrevida das mulheres com carcinoma de ovário. A partir da identificação das características clínico patológicas e a resposta a quimioterapia, considerando também a análise de sobrevida, a seleção dos SNPs do PD1 avaliados neste trabalho foi baseada na literatura disponível. Foi verificado inicialmente se as amostras de mulheres estavam em EHW nos loci dos SNPs avaliados PD1.1 (c.606G>A), PD1.5 (c.804C>T), PD1.9 c.644C>T, indicando que não houve distribuição preferencial dos genótipos. A amostra é portanto representativa da população geral e pode ser utilizada para o estudo.

As frequências entre os genótipos dos SNPs PD1.1 (c.-606G>A), PD1.5 (c.804C>T), PD1.9 (c.644C>T) são altamente variáveis entre etnias (92-94). Gomez et al. (96) encontraram uma distribuição dos genótipos do *PDCD1* semelhante a este estudo, em indivíduos brasileiros com melanoma cutâneo. Os SNPs PD1.1 (c.-606G>A), PD1.9 (c.644C>T) apresentaram um número de mulheres com o genótipo AA e TT, respectivamente bastante limitado ( $n = 1$ ) e foram agrupados ao heterozigoto de cada SNP (GA e CT, respectivamente), como também demonstrado na literatura (93,96). Apesar de ser não descrito nas variáveis do estudo, a mulher que apresentou o genótipo AA e TT, é de etnia asiática, e onde esses genótipos são mais prevalentes (92).

Em relação ao SNP PD1.5 (c.804C>T) a média da idade das mulheres com genótipo CC e CT foi maior que aquelas com genótipo TT ( $p = 0,02$ ). A presença do alelo T no polimorfismo SNP PD1.5(c.804C>T) provavelmente eleve a atividade dos linfócitos por alteração da expressão do gene *PCD1* e, conseqüentemente, apresentando uma maior destruição tumoral. Apesar de tratar-se de mutação silenciosa, ou seja, sem troca de aminoácidos na constituição da proteína final, possivelmente este SNP acarreta em desequilíbrio na relação

entre outros polimorfismos fazendo com que esteja ligado a alteração na resposta imune de alguns tipos de câncer e doenças autoimunes (92,94,98). Talvez esperaria-se o genótipo TT em mulheres mais velhas pelo melhor resposta imune ao tumor e consequentemente aparecimento do câncer mais tardiamente. No estudo realizado por Gomez et al. (96) não foi encontrado associação desse SNP com a idade, apesar do número elevado de indivíduos incluídos. O genótipo TT foi relacionado com redução de risco de câncer de ovário e não pequenas células de pulmão, entretanto o genótipo CC esteve relacionado com aumento do risco de câncer de mama e tumores de sistema nervoso central (94,109,110)

Houve uma proporção significativamente maior de mulheres com carcinomas serosos, doença residual pós-cirúrgica e estadios avançados com o genótipo CC do PD1.9 (c.644C>T) quando comparado com genótipo CT ou TT ( $p=0,01$ ,  $p=0,01$  e  $p=0,009$ , respectivamente), demonstrando talvez um caráter protetor neste sentido em relação ao alelo polimórfico referente a doença extensa ao diagnóstico. Entretanto, o número de pacientes com o genótipo TT do PD1.9 (c.644C>T) neste estudo foi bastante limitado ( $n=1$ ) e, portanto, este resultado deve ser visto com cautela. O SNP PD1.9 corresponde a troca do aminoácido Valina pelo Alanina alterando a estrutura da proteína e podendo alterar sua função. Relaciona-se o genótipo TT do SNP PD1.9 a uma melhor resposta imune antitumoral (100), o que corrobora os achados de Ren et al. (111) referentes ao menor risco de câncer de mama em mulheres com este genótipo. Além do mais, estudos adicionais são necessários para esclarecer as consequências desse SNP na proteína codificada (94).

A resposta à quimioterapia foi correlacionada com os SNPs do gene *PDCDI* e não foi encontrada associação significativa entre as variáveis. Esse é o primeiro estudo que correlaciona a resposta à quimioterapia com carboplatina e paclitaxel em mulheres com carcinoma de ovário.

Estudos avaliaram o risco do desenvolvimento de diferentes cânceres com os SNPs no gene *PDCDI*. Em um estudo realizado em Nagoya no Japão por Sasaki e colaboradores. (93) foi avaliado o SNP PD1.1 (c.-606G>A) em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células. O genótipo homozigoto variante AA, heterozigoto GA e homozigoto selvagem GG foram identificados em 25%, 50% e 25%, respectivamente. Foi evidenciado maior risco de desenvolvimento de câncer pulmonar no genótipo AA. Hua e colaboradores (94) observaram que genótipo GG do SNP PD1.1 (c.-606G>A) esteve associado com menor risco para câncer de mama. Li e colaboradores (92) avaliaram os SNPs PD1.1 (c.-606G>A) e PD1.5 (c.804C>T) em relação ao risco de desenvolvimento de carcinoma de ovário. Em comparação com o genótipo AA do SNP PD1.1 (c.-606G>A), os genótipos AG e GG podem diminuir

significativamente o risco de desenvolver carcinoma de ovário (OR = 0,71, IC95% = 0,54-0,94; OR = 0,68, IC95% = 0,50-0,94, respectivamente). Em comparação com as mulheres de alelos C, os portadores de alelos T apresentaram um risco significativamente menor de desenvolver carcinoma de ovário (OR = 0,82, IC95% = 0,69-0,98) no SNP PD1.5 (c.804C>T).

O tempo de SLP e SG entre as mulheres incluídas no estudo foram de 13 meses e a 24 meses, respectivamente. A média de seguimento correspondeu a 20 meses variando de 20 dias a 46 meses. Observa-se que as mulheres com o carcinoma tipo II apresenta um Hazard Ratio de 3,8 (IC95% 1,7-8,3) de progredirem pela doença em relação às mulheres com carcinoma tipo I. As mulheres em estágio avançado apresenta um Hazard Ratio de 4,4 (IC95% 2,0-9,5) de progredirem pela doença em relação às mulheres em estágio I/II. As mulheres com doença residual apresentaram um Hazard Ratio de 4,2 (IC95% 2,0-8,9) de progredirem em relação às mulheres sem a presença de doença residual. SLP e SG também estiveram associadas em mulheres que foram submetidas ao tratamento neoadjuvante de quimioterapia (HR=2,3 e IC95% 1,3-4,3; HR=3,6 e IC95% 1,4-9,2) e em mulheres que foram resistente/refratria ao tratamento baseado em platina (HR=5,8 e IC95% 3,0-11,2; HR:5,9 e IC95% 2,1-16,2). Resultados foram semelhantes conforme descrições prévias (31,104,112). Estes dados foram concordantes com a literatura, uma vez que as mulheres com diagnóstico de carcinoma tipo II apresentaram características clínicas, resposta a quimioterapia e fatores de sobrevida piores (31).

No presente trabalho não foi observado associações significativas em relação à SLP e SG com os SNPs no gene *PDCD1*, semelhante ao estudo realizado por Li e colaboradores. (92). Porém Sasaki e colaboradores (93) observaram que o polimorfismo PD1.1 (c.-606G>A) pode ser um marcador para a progressão do câncer de pulmão não pequenas células. O estudo demonstrou que essa associação pode estar relacionada a maiores frequências do genótipo AA e do alelo A em PD-1.1 (c.-606G>A) nos casos positivos para p53. A análise de sobrevida precisa ser realizada em estudos futuros com mulheres com carcinoma de ovário em diversas partes do mundo.

## 6. CONCLUSÃO

- Mulheres com carcinoma ovariano do Tipo II apresentam maior média de idade ao diagnóstico, maior frequência de carcinomas serosos, estadios mais avançados, maior média nos valores de CA 125, maior número de doença residual pós cirúrgica, maior necessidade de quimioterapia neoadjuvante, menor resposta a platina e maior número de mulheres vivas com doença ou que evoluíram para óbito ao final do seguimento;
- As frequências dos genótipos mutados dos polimorfismos PD1.1, PD1.5 e PD1.9 correspondem respectivamente a: 14%, 72% e 12%.
- Mulheres com genótipo TT referente ao polimorfismo SNP PD1.5 apresentam menor idade ao diagnóstico; mulheres com genótipos CT/TT referentes ao polimorfismo SNP PD1.9 apresentaram maior presença em carcinomas não serosos, maior frequência de estadios iniciais ao diagnóstico e menores taxas de doença residual pós cirúrgica; Não foi encontrada relação significativa dos polimorfismos com resposta a quimioterapia;
- Neste estudo os polimorfismos SNP PD1.1(c.606G>A), SNP PD1.5(c.804C>T) e SNP PD1.9(c.644C>T) do gene *PDCD1* não influenciaram na sobrevida livre de progressão ou sobrevida global;

## 7. REFERÊNCIAS

1. Berek, J. S.; Crum, C.; Friedlander, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 119 Suppl 2:S118-29 2012.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
4. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0. [Cited 2018, April 22]. Available from: <[https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf)>. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines. Available at <http://www.nccn.org>.
5. Silva I. Estimativa 2018/Incidência de Câncer no Brasil. In: Saúde Md, editor. Instituto Nacional do Câncer 2018. p. 52.
6. Tschernichovsky R, Goodman A. Risk-Reducing Strategies for Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: A Balancing Act. *Oncologist*. 2017;22(4):450-9.
7. Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, Cohn DE, Kauff ND, Duska LR, et al. SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol Oncol*. 2010;119(1):7-17.
8. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017;14(1):9-32.
9. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol*. 2009;3(2):97-137.
10. Lewis DR, Chen HS, Midthune DN, Cronin KA, Krapcho MF, Feuer EJ. Early estimates of SEER cancer incidence for 2012: Approaches, opportunities, and cautions for obtaining preliminary estimates of cancer incidence. *Cancer*. 2015;121(12):2053-62.
11. Lu Y, Cuellar-Partida G, Painter JN, Nyholt DR, Morris AP, Fasching PA, et al. Shared genetics underlying epidemiological association between endometriosis and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2015;24(20):5955-64.



12. Beral V, Gaitskell K, Hermon C, Moser K, Reeves G, Peto R, et al. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet*. 2015;385(9980):1835-42.
13. Olsen CM, Nagle CM, Whiteman DC, Ness R, Pearce CL, Pike MC, et al. Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(2):251-62.
14. Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G, Cancer CGoESoO. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*. 2008;371(9609):303-14.
15. Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, et al. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2013;122(1):139-47.
16. Li DP, Du C, Zhang ZM, Li GX, Yu ZF, Wang X, et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(12):4829-37.
17. Gaitskell K, Green J, Pirie K, Reeves G, Beral V, Collaborators MWS. Tubal ligation and ovarian cancer risk in a large cohort: Substantial variation by histological type. *Int J Cancer*. 2016;138(5):1076-84.
18. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol*. 2014;133(3):401-4.
19. Hoskins WJ. Surgical staging and cytoreductive surgery of epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 1993;71(4 Suppl):1534-40.
20. Zanetta G, Chiari S, Rota S, Bratina G, Maneo A, Torri V, et al. Conservative surgery for stage I ovarian carcinoma in women of childbearing age. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997;104(9):1030-5.
21. Park JY, Kim DY, Suh DS, Kim JH, Kim YM, Kim YT, et al. Outcomes of fertility-sparing surgery for invasive epithelial ovarian cancer: oncologic safety and reproductive outcomes. *Gynecol Oncol*. 2008;110(3):345-53.
22. Menczer J. Conservative fertility-sparing surgical treatment of invasive epithelial ovarian cancer: when is it acceptable? *Isr Med Assoc J*. 2013;15(2):116-20.
23. Nik NN, Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:27-45.

24. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2011;305(22):2295-303.
25. Nagle CM, Francis JE, Nelson AE, Zorbas H, Luxford K, de Fazio A, et al. Reducing time to diagnosis does not improve outcomes for women with symptomatic ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2253-8.
26. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
27. Urban RR, Smith A, Agnew K, Bonato V, Goff BA. Evaluation of a Validated Biomarker Test in Combination With a Symptom Index to Predict Ovarian Malignancy. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(2):233-8.
28. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10022):945-56.
29. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1511-8.
30. Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(2):151-60.
31. Kurman RJ, Shih IM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016;186(4):733-47.
32. Kurman RJ, Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):433-43.
33. Kurman RJ, Shih IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 2011;42(7):918-31.
34. Schmeler KM, Tao X, Frumovitz M, Deavers MT, Sun CC, Sood AK, et al. Prevalence of lymph node metastasis in primary mucinous carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol*. 2010;116(2 Pt 1):269-73.
35. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(2):161-74.

36. Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih IM, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol*. 2010;34(10):1407-16.
37. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015;521(7553):489-94.
38. Aabo K, Adams M, Adnitt P, Alberts DS, Athanazziou A, Barley V, et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *Br J Cancer*. 1998;78(11):1479-87.
39. Piccart MJ. RESPONSE: re: randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(17):1446-7.
40. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(17):1320-9.
41. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(22):1682-91.
42. Schorge JO, Eisenhauer EE, Chi DS. Current surgical management of ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26(1):93-109.
43. Mills K, Fuh K. Recent Advances in Understanding, Diagnosing, and Treating Ovarian Cancer. *F1000Res*. 2017;6:84.
44. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. 2003;103(3):645-62
45. Harrap KR. Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev*. 1985;12 Suppl A:21-33.
46. Guminski AD, Harnett PR, deFazio A. Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. *Lancet Oncol*. 2002;3(5):312-8.
47. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2003;21(17):3194-200.

48. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(15):1247-59.
49. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, et al. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1263-8.
50. Bell J, Brady MF, Young RC, Lage J, Walker JL, Look KY, et al. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2006;102(3):432-9.
51. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(10):943-53.
52. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet.* 2015;386(9990):249-57.
53. Young RC, Decker DG, Wharton JT, Piver MS, Sindelar WF, Edwards BK, et al. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *JAMA.* 1983;250(22):3072-6.
54. Trimbos JB, Parmar M, Vergote I, Guthrie D, Bolis G, Colombo N, et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(2):105-12.
55. Chi DS, Zivanovic O, Levinson KL, Kolev V, Huh J, Dottino J, et al. The incidence of major complications after the performance of extensive upper abdominal surgical procedures during primary cytoreduction of advanced ovarian, tubal, and peritoneal carcinomas. *Gynecol Oncol.* 2010;119(1):38-42.
56. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, et al. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Gynecol Oncol.* 2016;143(1):3-15.
57. Gadducci A, Cosio S, Zizioli V, Notaro S, Tana R, Panattoni A, et al. Patterns of Recurrence and Clinical Outcome of Patients With Stage IIIC to Stage IV Epithelial Ovarian Cancer in Complete Response After Primary Debulking Surgery Plus Chemotherapy or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking

- Surgery: An Italian Multicenter Retrospective Study. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(1):28-36.
58. Fagotti A, Ferrandina G, Vizzielli G, Fanfani F, Gallotta V, Chiantera V, et al. Phase III randomised clinical trial comparing primary surgery versus neoadjuvant chemotherapy in advanced epithelial ovarian cancer with high tumour load (SCORPION trial): Final analysis of peri-operative outcome. *Eur J Cancer*. 2016;59:22-33.
  59. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*. 2014;133(3):624-31.
  60. Friedlander ML, Stockler MR, Butow P, King MT, McAlpine J, Tinker A, et al. Clinical trials of palliative chemotherapy in platinum-resistant or -refractory ovarian cancer: time to think differently? *J Clin Oncol*. 2013;31(18):2362.
  61. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi24-32.
  62. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1257.
  63. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31(15):1869-83.
  64. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL, Chakravarty P, Scott AL, Bray SE, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 2016;115(4):431-41.
  65. Monk BJ, Minion LE, Coleman RL. Anti-angiogenic agents in ovarian cancer: past, present, and future. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i33-i9.
  66. Parkes EE, Kennedy RD. Clinical Application of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Oncologist*. 2016;21(5):586-93.
  67. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1302-8.
  68. Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or

- without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;139(1):10-6.
69. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):87-97.
  70. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol*. 2015;33(3):244-50.
  71. Zhu X, Lang J. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2016;142(1):184-9
  72. Ascierto PA, Addeo R, Cartenì G, Daniele B, De Laurentis M, Ianniello GP, et al. The role of immunotherapy in solid tumors: report from the Campania Society of Oncology Immunotherapy (SCITO) meeting, Naples 2014. *J Transl Med*. 2014;12:291.
  73. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.
  74. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(34):4015-22.
  75. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-95.
  76. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):467-77.
  77. Gianchecchi E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(11):1091-100.
  78. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
  79. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009;229(1):114-25.
  80. Gaillard SL, Secord AA, Monk B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2016;3:11.

81. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-29.
82. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:17-37.
83. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
84. Maine CJ, Aziz NH, Chatterjee J, Hayford C, Brewig N, Whilding L, et al. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(3):215-24.
85. Hamanishi J, Mandai M, Konishi I. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer. *Int Immunol*. 2016;28(7):339-48.
86. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(12):2965-70.
87. Ioannides CG, Freedman RS, Platsoucas CD, Rashed S, Kim YP. Cytotoxic T cell clones isolated from ovarian tumor-infiltrating lymphocytes recognize multiple antigenic epitopes on autologous tumor cells. *J Immunol*. 1991;146(5):1700-7.
88. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):192-8.
89. Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, et al. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol*. 2011;141(3):338-47.
90. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2):293-302.
91. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(6):593-601

92. Li Y, Zhang HL, Kang S, Zhou RM, Wang N. The effect of polymorphisms in PD-1 gene on the risk of epithelial ovarian cancer and patients' outcomes. *Gynecol Oncol.* 2017;144(1):140-5.
93. Sasaki H, Tatemayasu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):1035-42
94. Hua Z, Li D, Xiang G, Xu F, Jie G, Fu Z, et al. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(1):195-201.
95. Lee SY, Jung DK, Choi JE, Jin CC, Hong MJ, Do SK, et al. PD-L1 polymorphism can predict clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. *Sci Rep.* 2016;6:25952.
96. Gomez GVB, Rinck-Junior JA, Oliveira C, Silva DHL, Mamoni RL, Lourenço GJ, et al. PDCD1 gene polymorphisms as regulators of T-lymphocyte activity in cutaneous melanoma risk and prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31(2):308-17.
97. de Vooght KM, van Solinge WW. Gene promoter analysis in molecular diagnostics: do or don't? *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(5):403-5.
98. Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, et al. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):770-5.
99. Mojtahedi Z, Mohmedi M, Rahimifar S, Erfani N, Hosseini SV, Ghaderi A. Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene.* 2012;508(2):229-32.
100. Qiu H, Zheng L, Tang W, Yin P, Cheng F, Wang L. Programmed death-1 (PD-1) polymorphisms in Chinese patients with esophageal cancer. *Clin Biochem.* 2014;47(7-8):612-7.
101. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Glossário - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/glossario\\_PNAD.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/glossario_PNAD.pdf)> Acesso em 11 abr 2018.
102. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, e cols. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(2):419-23.



103. Ferrero A, Fuso L, Tripodi E, Tana R, Daniele A, Zanfagnin V, et al. Ovarian Cancer in Elderly Patients: Patterns of Care and Treatment Outcomes According to Age and Modified Frailty Index. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(9):1863-1871.
104. Sallum LF, Andrade L, Ramalho S, Ferracini AC, de Andrade Natal R, Brito ABC, et al. WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis. *Oncotarget*. 2018a;9(22):15818-15827.
105. Lambrechts S, Lambrechts D, Despierre E, Van Nieuwenhuysen E, Smeets D, Debruyne PR, et al. Genetic variability in drug transport, metabolism or DNA repair affecting toxicity of chemotherapy in ovarian cancer. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2015;16:2.
106. Camerin GR, Brito AB, Vassallo J, Derchain SF, Lima CS. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients. *Future Oncol*. 2017;13(5):409-414.
107. Sallum LF, Andrade L, Bastos Eloy da Costa L, Ramalho S, Ferracini AC, Natal RA, et al. BRCA1, Ki67, and  $\beta$ -Catenin Immunoexpression Is Not Related to Differentiation, Platinum Response, or Prognosis in Women With Low- and High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2018b;28(3):437-447
108. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. 2: p. 16061
109. Dong W, Gong M, Shi Z, Xiao J, Zhang J, Peng J. Programmed Cell Death-1 Polymorphisms Decrease the Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving Twelve Case-Control Studies. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152448.
110. Zhang J, Zhao T, Xu C, Huang J, Yu H. The association between polymorphisms in the PDCD1 gene and the risk of cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(40):e4423.
111. Ren HT, Li YM, Wang XJ, Kang HF, Jin TB, Ma XB, et al. PD-1 rs2227982 Polymorphism Is Associated With the Decreased Risk of Breast Cancer in Northwest Chinese Women: A Hospital-Based Observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(21):e3760.
112. Boussios S, Zarkavelis G, Seraj E, Zerdes I, Tatsi K, Pentheroudakis G Non-epithelial Ovarian Cancer: Elucidating Uncommon Gynaecological Malignancies. *Anticancer Res*, 2016;36(10):5031-5042.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Luis Otávio Zanatta Sarian, Coordenador do Biobanco do CAISM, convido gentilmente o participante da pesquisa a ceder o material de origem biológica:

- Componente sólido do sangue, soro e plasma: no momento da coleta de sangue (20 mL no total) poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucas horas.
- Tecido congelado: um fragmento do tecido (menor que 5 mm em sua maior dimensão) será retirado durante o meu processo cirúrgico e será examinado para não haver prejuízos no diagnóstico. Após esse processo, sei que ele será armazenado para pesquisas futuras.
- Tecido fixado em bloco de parafina: um fragmento do tecido será retirado durante o meu processo cirúrgico, processado e fixado em parafina, a posteriori, e será examinado para não haver prejuízos no diagnóstico. Após esse processo, sei que ele será armazenado para pesquisas futuras.
- Líquido amniótico: a coleção de líquido amniótico (5 mL no total) será coletado por motivo do trabalho do parto, oferecendo riscos mínimos para mim e para o neonato. Eu sei que em qualquer situação de complicação, minha situação será resolvida sem qualquer tipo de perda.
- Urina: não há riscos decorrentes da coleta de urina. A coleta será individualizada e em ambiente privado. Após a explicação de como deve ser coletado a urina, ficarei a vontade para a realização do procedimento.
- Fezes: não há riscos decorrentes da coleta de fezes. A coleta será individualizada e em ambiente privado. Após a explicação de como deve ser coletado a fezes, ficarei a vontade para a realização do procedimento.
- Cabelo: não há riscos decorrentes da coleta de cabelo (20 fios). A coleta será individualizada e em ambiente privado. Após a explicação de como deve ser coletado o cabelo, ficarei a vontade para escolher o posicionamento da coleta do cabelo para o Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. Dr. José Aristodemo Pinotti.

O material será coletado e será armazenado no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti. O material concedido será utilizado em pesquisas científicas que obrigatoriamente devem ser enviadas ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP)/ UNICAMP para apreciação e liberação de parecer. Somente aquelas que obtiverem parecer positivo poderão utilizar o material armazenado neste biobanco. Os estudos realizados com o material concedido envolverão pesquisas na área de Ginecologia e Obstetrícia. Estas pesquisas serão úteis para elucidação dos processos pertinentes a doenças ginecológicas e obstétricas, podendo melhorar futuros tratamentos e atenção clínica.

Ao convidá-lo(a), gostaríamos de esclarecer que:

1. A concessão do material de origem biológica é livre e não causará quaisquer prejuízos pessoais ou ao andamento da atenção médica.
2. Suas informações pessoais serão mantidas em sigilo e privacidade, pois suas respostas serão analisadas em conjunto com as respostas de todos os outros participantes da pesquisa.
3. Você é livre para desautorizar o uso de suas respostas/amostras a qualquer momento, sem prejuízo ou penalização alguma às partes envolvidas. Uma vez desautorizada, serei solicitado(a) a formalização da minha manifestação por escrito e assinada, cabendo-me a devolução das minhas amostras.
4. Você será comunicado sobre a necessidade de descarte do material armazenado, o que poderá ocorrer se a amostra não atender a critérios mínimos de qualidade para pesquisa, se houver dificuldades institucionais para seu armazenamento (espaço) ou se o biobanco deixar de existir. Nos dois últimos casos, deveremos ofertar seu material à outra instituição de pesquisa que possui biobanco aprovado pela CONEP e informar ao CEP PRP/ UNICAMP, que informará a CONEP. Caso ocorra o transporte do material biológico para outra instituição, você será informado do local para qual foi realocado.
5. Caso o material seja descartado, será feito de acordo com as normas de biossegurança legais;
6. Você terá livre acesso aos resultados obtidos nas pesquisas realizadas com seu material biológico;
7. O material concedido ficará sob a guarda do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (FCM-UNICAMP), sob cuidados dos responsáveis pelo biobanco, e será utilizado como dados de pesquisa científica, podendo vir a ser divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando-se sempre o sigilo quanto à sua identidade e dos demais participantes da pesquisa.
8. A realização de pesquisas futuras utilizando o material depositado no biobanco necessita obrigatoriamente de aprovação do CEP PRP/ UNICAMP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), o qual deverá estar ciente da utilização deste material.

9. Você terá acesso gratuito:
- às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado;
  - às informações obtidas a partir de seu material biológico humano utilizado;
  - às informações genéticas obtidas a partir do seu material biológico humano utilizado, inclusive, aquelas que impliquem em riscos para doenças não preveníveis ou riscos familiares;
  - ao aconselhamento genético, quando aplicável;
  - às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade de conservação e integridade de seu material biológico, e as medidas para garantir a privacidade e confidencialidade.
10. Este TCLE deverá ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as páginas pelo participante da pesquisa ou seu responsável legal e pelo pesquisador responsável, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu responsável legal e uma arquivada pelo pesquisador.
11. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com o CEP PRP/ UNICAMP, que é o órgão responsável por garantir os cuidados éticos das pesquisas realizadas com o seu material. O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Em caso de dúvidas sobre as amostras cedidas ao biobanco, você poderá entrar em contato com: Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, Campinas – SP; telefone: (19) 3521-9194; e-mail: luis.sarian@fcm.unicamp.br. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas de estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30 hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, Campinas – SP; telefone: (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br. Diante destas informações, declaro meu consentimento livre para ceder o material de origem biológica para o Biobanco do CAISM, assinando o presente termo:

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

Participante da pesquisa: \_\_\_\_\_ ou Responsável legal (em caso de participante da pesquisa menor de idade ou incapaz): \_\_\_\_\_  
Tel: (\_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Aceito conceder o material para o Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti FCM/UNICAMP:

☐ Sim

☐ Não

Declaro ainda que (assinale apenas uma das alternativas abaixo):

☐ a cada nova pesquisa realizada com o material biológico concedido e armazenado no Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti FCM/UNICAMP quero ser contatada para ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da nova pesquisa e decidir se permito ou não que a minha amostra armazenada seja utilizada;

☐ novas pesquisas realizadas com o material biológico concedido e armazenado no Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti FCM/UNICAMP podem ser realizadas sem a necessidade de minha aprovação para uso em cada uma delas.

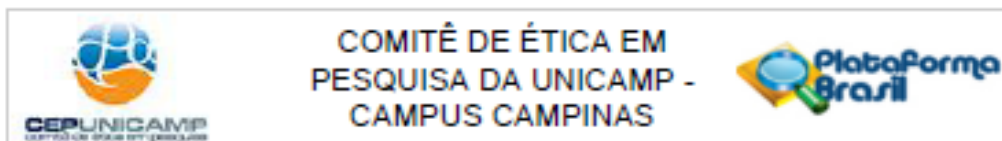
Em caso de morte ou incapacidade, quem responderá pelo uso do material biológico concedido e armazenado no Biobanco do CAISM do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti FCM/UNICAMP será:

NOME: \_\_\_\_\_ Tel: (\_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Coordenador do Biobanco do CAISM: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS HERDADOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

**Pesquisador:** Amanda Canato Ferradini

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 57829316.1.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

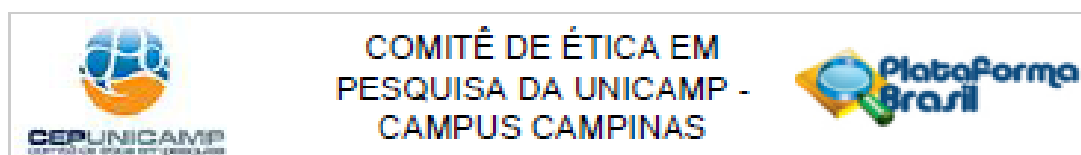
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.744.903

#### Apresentação do Projeto:

O câncer de ovário atualmente é a quinta causa de morte referente a neoplasias malignas em mulheres, correspondendo a 47% das mortes secundárias a tumores ginecológicos e com pior sobrevida (FERLAY et al., 2012). Nos Estados Unidos, estimam-se 22.000 novos casos de câncer de ovário em 2016, com cerca de 14.000 mortes relacionadas a neoplasia, o que corresponde a uma incidência de 9 a 17 por 100.000 mulheres (BEREK, CRUM e FRIEDLANDER, 2012; SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2016). No Brasil foram registrados 6.150 novos casos em 2016 com sobrevida média de 40% em 5 anos (INCA, 2015). Os carcinomas de ovário, ou seja, as neoplasias malignas epiteliais correspondem a 90% dos casos (LEE et al., 2003; PRAT, 2004). Polimorfismos relacionados à angiogênese tumoral e, mais especificamente, ao Fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF), têm sua importância em mulheres com carcinoma de ovário, principalmente no que diz respeito à sobrevida (ARTINI et al., 2008; KUMARAN, JAYSON e CLAMP, 2009). Os polimorfismos VEGF 634G/C, 1154G/A, e 2578C/A alteram a expressão deste e, consequentemente, sua atividade (LOSE et al., 2010). O carcinoma de ovário, a cirurgia e a quimioterapia alteram a qualidade de vida. Mulheres tratadas por carcinoma de ovário apresentam um aumento significativo de fadiga, náuseas, vômitos, dor, dispnéia, insônia e perda de apetite tanto a curto como a longo prazo (AHMED-LECHEHEB e JOLY, 2016). Essas alterações podem persistir por anos.

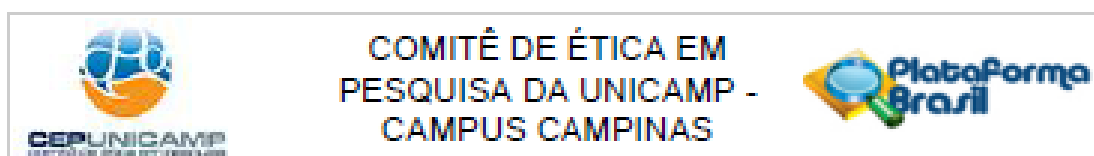
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.744.903

após o término do tratamento. Estima-se que 51% das pacientes submetidos a quimioterapia com derivados da platina e paclitaxel apresentem sintomas neuropáticos até 12 anos após tratamento (EZENDAM et al., 2014). A doença e o tratamento não são inócuos e repercutem de modo importante na qualidade de vida da maioria das mulheres. **JUSTIFICATIVAS** A identificação de características genéticas, como polimorfismos, que possam predizer a resposta a platina, a sobrevida livre de progressão de doença e/ou global, e a sua toxicidade, poderá contribuir na seleção as mulheres com carcinoma de ovário tipo 1 e 2 que se beneficiarão com tratamento com derivados da platina e paclitaxel. Ainda há poucos estudos que avaliam os polimorfismos específicos e a resposta a platina. É importante avaliar estes polimorfismos em mulheres brasileiras com carcinoma de ovário. O CAISMUNICAMP é um centro de referência para diagnóstico, tratamento e pesquisas do carcinoma de ovário; oferece um ambiente adequado para investigação destas características genéticas. A identificação das mulheres que se beneficiarão com a quimioterapia trará um grande benefício na qualidade de vida. Não havendo associação significativa entre a frequência de polimorfismos específicos e a resposta aos derivados da platina e/ou sobrevida em mulheres com carcinoma de ovário, será possível dirigir a investigação de outros marcadores genéticos nos próximos estudos. **Resumo Informativo Objetivo:** O objetivo deste estudo irá avaliar a associação entre marcadores genéticos herdados em mulheres com carcinoma de ovário com a resposta quimioterapia e reações adversas com carboplatina e paclitaxel, sobrevida livre de progressão, sobrevida global e qualidade de vida. **Metodologia:** Esse estudo uma coorte observacional que avaliará pacientes com carcinoma de ovário atendidas no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que receberem carboplatina e paclitaxel como tratamento da doença. Serão incluídas 136 mulheres com carcinoma de ovário classificadas como casos novos e doença tratada (livre de doença), em progressão ou recidivada que aceitaram a ceder o material de origem biológica do componente sólido do sangue, soro e plasma e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM-UNICAMP) (CONEP B-056). Os marcadores genéticos correspondentes a polimorfismos de detoxificação, de reparo de DNA, relacionados a apoptose celular, e angiogênese serão analisados por meio de PCR e digestão enzimática ou PCR em tempo real em DNA extraído de sangue periférico. Todas as reações adversas e toxicidades detectadas serão documentadas e classificadas segundo sua gravidade. O questionário de qualidade de vida será aplicado nas mulheres com carcinoma de ovário classificadas como casos novos e que iniciarão o tratamento com carboplatina e paclitaxel. O questionário será aplicado novamente no

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.063-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Protocolo: 1.744.903

quarto e no sexto ciclo da quimioterapia. Os dados demográficos e clínicos das participantes do estudo serão obtidos através do prontuário. **Análise de dados:** Os dados adquiridos e anotados na ficha de coleta serão transferidos para planilhas eletrônicas tipo Microsoft Excel. Os dados serão analisados através do pacote estatístico R. O nível de significância assumido será de 5%.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Geral**

Avaliar a associação entre marcadores genéticos herdados em mulheres com carcinoma de ovário tipo 1 e tipo 2 com a resposta a platina, sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

##### **Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar a associação entre idade, estágio e os carcinomas Tipos 1 e 2
- 2) Avaliar a frequência de marcadores genéticos correspondentes a polimorfismos de detoxificação, de reparo de DNA, relacionados a apoptose celular e angiogênese tumoral
- 3) Avaliar a taxa de resposta a carboplatina e paclitaxel em mulheres com carcinoma de ovário tipo 1 e 2
- 4) Caracterizar as reações adversas e efeitos de toxicidade da carboplatina e paclitaxel
- 5) Avaliar a relação entre os marcadores genéticos correspondentes a polimorfismos de detoxificação, de reparo de DNA, relacionados a apoptose celular, e angiogênese tumoral e a resposta a carboplatina e paclitaxel, assim como com as reações adversas e toxicidade
- 6) Avaliar a relação entre os marcadores genéticos correspondentes a polimorfismos de detoxificação, de reparo de DNA, relacionados a apoptose celular e angiogênese tumoral com a sobrevida livre de progressão e sobrevida global
- 7) Avaliar a resposta a carboplatina e paclitaxel e a sobrevida livre de progressão com a qualidade de vida
- 8) Comparar a qualidade de vida geral pré e pós tratamento com carboplatina e paclitaxel.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Desconfortos e riscos:**

A pesquisa não modifica a conduta médica indicada pelo protocolo do serviço para seu caso e não apresenta riscos previsíveis.

##### **Benefícios:**

Os resultados obtidos a partir da aplicação do questionário de qualidade de vida poderão fornecer evidências para a resposta a platina, a sobrevida livre de progressão de doença e/ou global e a sua

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br





## COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.744.903

toxicidade antes e após a quimioterapia. Deste modo, a partir do questionário de qualidade de vida será possível identificar as queixas e reduzir problemas relacionados com bem-estar físico, social e familiar, emocional e bem estar funcional.

Sabe que os dados que serão obtidos com essa pesquisa poderão servir para conhecimentos futuros e influenciar ou não nos tratamentos e outras opções médicas no seu caso, e em pessoas com o risco de desenvolver o câncer, inclusive membros de sua família. A pesquisa não haverá benefícios a participante, havendo apenas os benefícios sociais como descrito acima.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de doutorado da pós-graduanda Amanda Canto Ferracini e, ainda, trabalho de mestrado do pós-graduando Guilherme Nogueira Aires do programa de pós-graduação em Tocoginecologia. Ambos pós-graduandos indicados como pesquisadores responsáveis e orientados pelas Profas. Dras. Priscila Gava Mazzola e Sophie Derchaln. Nesta pesquisa, pretende-se avaliar a associação entre marcadores genéticos herdados em mulheres com carcinoma de ovário tipo 1 e tipo 2 com a resposta a platina, sobrevida livre de progressão e sobrevida global. Para isso, pretende-se incluir no estudo 136 pacientes com carcinoma de ovário, atendidas no Ambulatório de Ovário, no Ambulatório de Oncologia Clínica e Unidade de Internação de Oncologia Clínica e Cirúrgica do CAISMUNICAMP. O seguimento das pacientes com carcinoma de ovário é realizado no CAISM e é contínuo até o óbito. Serão excluídas mulheres diagnosticadas com tumores extraovarianos. As mulheres participantes serão submetidas as seguintes intervenções: 1) Colheita de dois tubos de sangue (um tubo seco e um tubo com EDTA) no momento da consulta, os quais serão utilizados para extração de DNA e detecção de polimorfismos; 2) aplicação de questionário de qualidade de vida (FACT-O) no momento da inclusão da participante e, novamente, no quarto e no sexto ciclo de quimioterapia; 3) colheita dos dados demográficos e do tratamento, obtidos por meio de prontuários. Todas as intervenções serão realizadas nos momentos que as participantes estiverem no CAISM para consultas relacionadas à rotina terapêutica. Os riscos e/ou desconfortos associados aos procedimentos da pesquisa são dor e/ou pequenas manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue (punção venosa) e riscos associados à confidencialidade (sigilo da identidade do participante). Os pesquisadores informam o compromisso de preservar a identidade dos participantes. Haverá retenção de matéria biológica em banco e justifica-se: "O material biológico das mulheres com carcinoma de ovário é realizada no momento da consulta como caso novo ou retorno que aceitaram a ceder o material de origem biológica do componente sólido do sangue, soro e plasma e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco do Centro

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8938

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.441.854

pesquisador como associar a qualidade de vida e marcadores genéticos como polimorfismos herdados em mulheres com carcinoma de ovário com a resposta quimioterapia, toxicidade com carboplatina e paclitaxel e sobrevida destas mulheres."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Para avaliação desta emenda foram analisados os seguintes documentos anexados:

1-PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1043557\_E1.pdf 29/11/2017 10:06:58;

2-ALTERACAO\_TITULO.pdf 29/11/2017 10:05:06

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

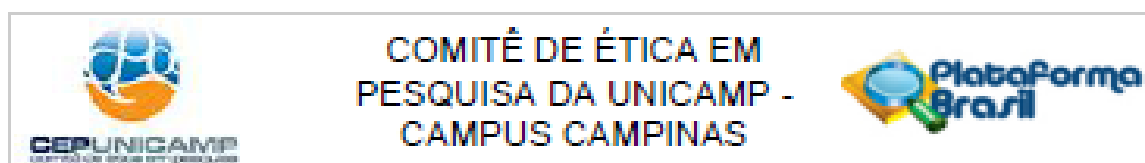
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br





Continuação do Parecer: 1.744.903

de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM-UNICAMP) (CONEP B- 056). São coletados 2 tubos de amostras pelas enfermeiras atendidas no Ambulatório de Ovário, no Ambulatório de Oncologia Clínica e Unidade de Internação de Oncologia Clínica e Cirúrgica do CAISMUNICAMP: um de tubo de EDTA (tampa roxa) e um tubo seco (tampa vermelha). Para armazenamento do material biológico no Biobanco, a amostra é encaminhada ao LAPE – CAISM/UNICAMP, aos cuidados de patologista responsável. O processamento do sangue é realizado no LAPE – CAISM/UNICAMP\*.

As amostras utilizadas serão aquelas armazenadas no Biobanco do CAISM (já regulamentado e aprovado) após as mulheres aceitaram a ceder o material de origem biológica do componente sólido do sangue, soro e plasma e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISMUNICAMP) (CONEP B-056).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Amanda Canato Ferradini pós-graduanda do programa de doutorado em Ciências Médicas –FCM e por Lutz Otávio Zanatta Sarian, Diretor Executivo/Superintendente do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti –CAISM, Instituição Indicada como proponente.
2. TCLE biobanco.
3. TCLE qualidade de vida. Última versão SEG\_Rev\_TCLE\_qualidade\_de\_vida.pdf de 15/09/2016 ainda com recomendações.
4. TALE biobanco. ( retirado )
5. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
6. Projeto completo.
7. Cronograma.
8. Orçamento.
9. Declaração Biobanco.

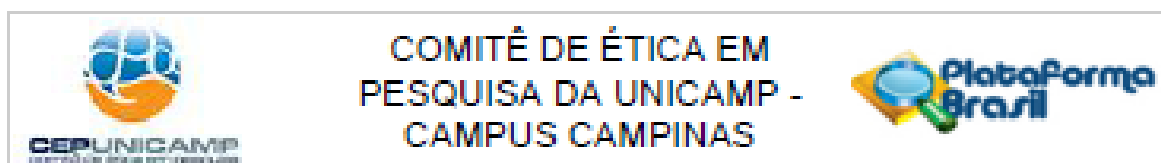
Tem aprovação da Comissão de Pesquisa do CAISM

**Recomendações:**

NO TCLE

1-Em Acompanhamento e assistência no TCLE " ..... Em casos de eventos adversos, a participante terá assistência que integram pelo tempo necessário." Deve ser assistência integral.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 128  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8608 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.744.903

2-Em Ressarcimento: "A pesquisa não oferece não há riscos previsíveis, e que não haverá nenhuma despesa a participante, portanto não há necessidade de ressarcimento, uma vez que o estudo será feito em casos novos de pacientes diagnosticas...Por favor organizar a frase pois esta confusa.Já foi mencionado em riscos que "A pesquisa não oferece riscos previsíveis". Não precisa repetir em ressarcimento; aliás não deve ser mencionado aqui pois o ressarcimento por gastos não está relacionado neste caso a possíveis riscos da participação.

3- Em Procedimentos:estimar o tempo necessário para responder o questionário e de que forma ( auto aplicável, entrevista, etc)

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências do Parecer anterior:

#### PENDÊNCIAS

O projeto e TCLE estão confusos. Não é claro o que é específico deste estudo. Alguns momentos refere que haverá coleta de material biológico para biobanco e questionário de qualidade de vida, mas o TCLE só aborda qualidade de vida. Irá coletar amostra para o biobanco ou ira utilizar amostra do biobanco? PRECISA ESTAR ESCLARECIDO NO PROJETO E NO TCLE.

RESPOSTA: pesquisadora esclarece que o material biológico será do Biobanco do CAISM. O TCLE apenas para Qualidade de vida.

Análise: Pendência atendida

Há um TALE para menores de idade para o biobanco, mas o projeto não prevê inclusão de menores. E o TCLE para Qualidade de vida não refere menores.

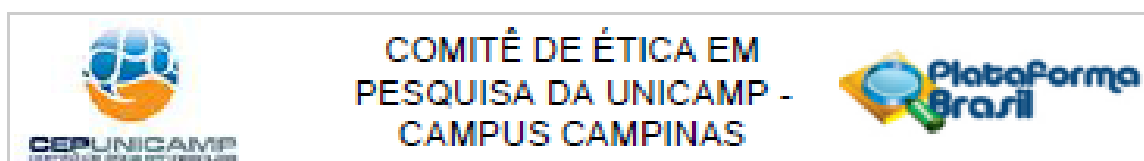
Resposta: Na presente pesquisa não será utilizado material armazenado no Biobanco de mulheres com carcinoma de ovário menores de 18 anos (o TALE foi retirado do processo submetido para Plataforma Brasil). Também não será aplicado para mulheres menores de 18 anos, o TCLE de qualidade de vida.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Ainda, no TCLE

1- A frase "A pesquisa não oferece risco e assim não haverá ressarcimentos ou indenização" deve ser retirada. Já foi descrito que não há riscos previsíveis, e que não haverá nenhuma despesa ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.063-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.744.903

participante, portanto não há necessidade de ressarcimento.

Resposta: O TCLE de qualidade de vida do projeto foi devidamente reescrito, com a finalidade de esclarecer a apresentação do projeto de pesquisa. A respectiva correção também apresenta em destaque (tarja amarela) no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Entretanto, A Resolução 466/12 (Item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito a indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas". Cabe enfatizar que a questão da indenização não é prerrogativa da Resolução 466/12, estando prevista no código civil. Portanto, solicitamos que seja assegurado, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa tem direito à indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa.

o ITEM "Acompanhamento e assistência: DEVE TAMBÉM DECLARAR QUE EM CASO DE EVENTOS ADVERSOS A PARTICIPANTE TERÁ ASSISTÊNCIA Integral PELO TEMPO NECESSÁRIO. Em Benefícios declarar que não haverá benefícios a participante. há apenas os benefícios sociais como descrito.

Resposta: Os Itens "ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA" e "BENEFÍCIOS" do TCLE de qualidade de vida do projeto foi devidamente reescrito, com a finalidade de esclarecer a apresentação do projeto de pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

## CONCLUSÃO

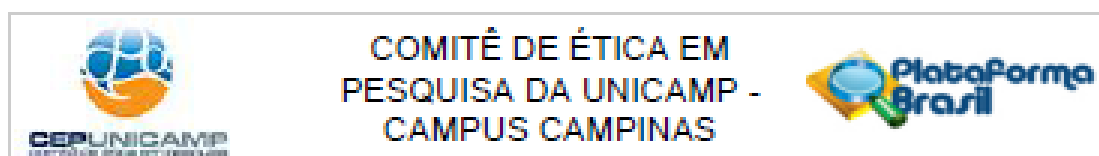
Projeto aprovado após resolução de algumas pendências. Entretanto foram apresentadas 3 recomendações que precisam ser atendidas. Solicitamos envio do TCLE final como notificação a este CEP para regulamentação do processo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As recomendações devem ser atendidas. Enviar como notificação na Plataforma Brasil o TCLE final.

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



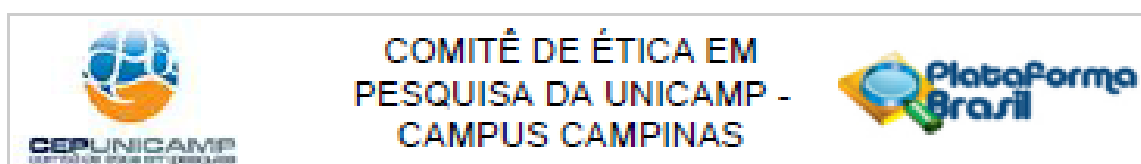
Continuação do Parecer: 1.744.203

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto a descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_753470.pdf	15/09/2016 20:41:55		Acelto
Outros	SEG_CARTA_RESPOSTA_CEP.pdf	15/09/2016 20:41:07	Amanda Canato Ferradini	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SEG_Rev_TCLE_qualidade_de_vida.pdf	15/09/2016 20:38:20	Amanda Canato Ferradini	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SEG_CORRECAO_FINAL_PROJETO_CORRETO.pdf	15/09/2016 20:37:54	Amanda Canato Ferradini	Acelto
Cronograma	REV_CRONOGRAMA.pdf	12/08/2016 09:51:46	Amanda Canato Ferradini	Acelto
TCLE / Termos de	TCLE_bloanco.pdf	09/07/2016	Amanda Canato	Acelto

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7167 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.744.903

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biobanco.pdf	10:47:59	Ferracini	Acelto
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	09/07/2016 10:47:36	Amanda Canato Ferracini	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	PARECER_CIRCUNSTANCIADO.pdf	09/07/2016 10:45:51	Amanda Canato Ferracini	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_BIOBANCO.pdf	09/07/2016 10:29:38	Amanda Canato Ferracini	Acelto
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/07/2016 10:26:58	Amanda Canato Ferracini	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Setembro de 2016

Assinado por:

Maria Fernanda Ribeiro Bittar  
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 128  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

### ANEXO 3: ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS HERDADOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

#### ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS HERDADOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

Oncologia – Hospital da Mulher Professor Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM – UNICAMP

HC: \_\_\_\_\_ Nome da Paciente: \_\_\_\_\_

Número: [       ]



#### ANÁLISE DE MARCADORES GENÉTICOS HERDADOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE OVÁRIO

Oncologia – Hospital da Mulher Professor Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM – UNICAMP

Número: [       ]

Data da primeira consulta no CAISM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### DADOS DEMOGRÁFICOS

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Raça ou Cor: [   ] Branca [   ] Preta [   ] Amarela [   ] Parda [   ] Indígena

Fumante: [   ] Sim [   ] Não

Comorbidade(s): [   ] Sim [   ] Não

\_\_\_\_\_[CID 10:       ]

\_\_\_\_\_[CID 10:       ]

\_\_\_\_\_[CID 10:       ]

\_\_\_\_\_[CID 10:       ]

\_\_\_\_\_[CID 10:       ]

Antecedente de neoplasia familiar: [   ] 8.1 Sim [   ] 8.2 Não

Qual? : \_\_\_\_\_

Data da Última Menstruação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Menopausa Espontânea: [   ] Sim [   ] Não



**Toxicidade durante ao tratamento:** ☐ 27.1 Sim ☐ 27.2 Não

**Toxicidade:**

Data	Ciclo	Toxicidade	Grau
___/___/___			
___/___/___			
___/___/___			
___/___/___			

**Número 2nd look** \_\_\_\_\_

Data	Progressão/Recidiva
___/___/___	
___/___/___	
___/___/___	

**Quimioterapia com platina na recidiva:** ☐ Sim ☐ Não

**Resposta a quimioterapia com platina na recidiva:** ☐ Sim ☐ Não

**Classificação:** ☐ Refratário ☐ Primariamente resistente ☐ Primariamente sensível

☐ Resistência Adquirida

**Data ultima consulta:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Situação:** ☐ Viva sem doença ☐ Viva com doença ☐ Óbito sem doença

☐ Óbito com doença

**Data do óbito:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Relacionado à doença:** ☐ Sim ☐ Não

**Perda de follow up:** ☐ Sim ☐ Não



## ANEXO 4: CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

07/10/2018

Gmail - Gynecologic Oncology: Submission Confirmation



Guilherme Aires &lt;guilhermeaires.go@gmail.com&gt;

---

### Gynecologic Oncology: Submission Confirmation

---

Gynecologic Oncology &lt;eesserver@eesmail.elsevier.com&gt;

7 de outubro de 2018 12:53

Responder a: Gynecologic Oncology &lt;gyn@elsevier.com&gt;

Para: guilhermeaires.go@gmail.com, ervilha42@hotmail.com

Cc: amanda.cferracini@gmail.com, angelobcbrito@gmail.com, leisaaguilar@yahoo.com.br, marmenl@fcm.unicamp.br, sophie.derchain@gmail.com, luis.sarian@gmail.com

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Title: PD1 polymorphism is associated with serous carcinoma, advanced stage and post-surgical residual disease in ovarian carcinoma

Corresponding Author: Mr. Guilherme Nogueira Aires

Authors: Amanda Ferracini; Angelo Brito; Leisa Aguiar; Carmen Lima; Luis Sarian; Sophie Derchain

Research Paper

Dear Mr. Aires,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Gynecologic Oncology.

Your manuscript will undergo a quick screening process to ensure that it meets all submission requirements. Please note that if your manuscript does not meet all submission requirements, it will be returned to you without being seen by an editor or reviewers.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Gynecologic Oncology as an author:

<https://ees.elsevier.com/gygynol/>

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Gynecologic Oncology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Editorial Office

Gynecologic Oncology

Elsevier

E-mail: [gyn@elsevier.com](mailto:gyn@elsevier.com)

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.